

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΓΑΜΕΤΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ
ΠΑΤΑΤΑΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΦΥΛΗΣ Y^N ΤΟΥ ΙΟΥ Υ ΤΗΣ
ΠΑΤΑΤΑΣ (PVY)^N

ΠΑΣΠΑΡΑΚΗ ΜΑΡΙΑ

Εισηγήτρια : Δρ. Γ. Γραμματικάκη – Αυγελή

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2003

Στον πολυαγαπημένο μου μπαμπά Λυκούργο
που δεν είναι κοντά μας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πριν να προβώ στην ανάπτυξη της πτυχιακής μου μελέτης αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους εκείνους που με στήριξαν κατά τη διάρκεια της πραγματοποίησης της.

Ευχαριστώ θερμά την καθηγήτρια του Εργαστηρίου Γεωργίας και Παραγωγής Πολλαπλασιαστικού Υλικού του Τ.Ε.Ι. Ηρακλείου Δρ. Γ. Γραμματικάκη – Αυγελή που μου υπέδειξε το θέμα, καθώς επίσης για την πολύτιμη βοήθεια της καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Α. Αυγελή, Ερευνητή του Ινστιτούτου Προστασίας Φυτών Ηρακλείου του ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε., για την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε κατά την πραγματοποίηση της πτυχιακής μου εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης το προσωπικό του Εργαστηρίου Γεωργίας και Παραγωγής Πολλαπλασιαστικού Υλικού (Δοξαστάκη Μαρίνα, Ταβουλάρη Παναγιώτη και Φωτιάδη Χρήστο) για τη σημαντική ηθική υποστήριξη και την πολύτιμη βοήθεια τους κατά την παραμονή μου στο προαναφερθέν εργαστήριο. Ακόμα ευχαριστώ το προσωπικό του Εργαστηρίου Φυτικής Ιολογίας του Ινστιτούτου Προστασίας Φυτών Ηρακλείου για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά την εκτέλεση των εργασιών του πειράματος μου.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω θερμά όλους τους φίλους μου που ήταν δίπλα μου και με στήριζαν όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και την Καλομοίρη – Χαιρέτη Αγάπη που μου παραχώρησε τον ηλεκτρονικό υπολογιστή για τη συγγραφή της εργασίας αυτής.

Τελειώνοντας ευχαριστώ θερμά την πολυαγαπημένη μου μητέρα Ηλέκτρα για την αμέριστη συμπαράσταση, την κατανόηση, τη συνεχή ηθική υποστήριξη και τη θαυμαστή υπομονή που έδειξε όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

	Σελ.
1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΤΑΤΑ (<i>SOLANUM TUBEROSUM L</i>)	8
1.1. Κέντρα καταγωγής	8
1.2. Εισαγωγή και διάδοση στην Ευρώπη και την Ελλάδα	9
1.3. Ταξινόμηση της πατάτας	10
1.4. Γενετική και Κυττογενετική.....	10
1.5. Παραγωγή στον κόσμο, στην Ευρώπη και στην Ελλάδα.....	11
1.6. Ελληνικά κέντρα σποροπαραγωγής	11
1.7. Σπουδαιότερες καλλιεργούμενες ποικιλίες στην Ελλάδα	12
2. ΣΠΟΥΔΑΙΟΤΕΡΕΣ ΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΤΗΣ ΠΑΤΑΤΑΣ.	14
2.1. Ο ιός Y της πατάτας (Potato Virus Y – PVY)	14
2.1.1. Φυσικοί ξενιστές και συμπτώματα	14
2.1.2. Μετάδοση	14
2.1.3. Γεωγραφική κατανομή	16
2.1.4. Μορφολογία των ιοσωματιδίων	16
2.1.5. Βιοχημικά χαρακτηριστικά	17
2.2. Ο ιός A της πατάτας (Potato Virus A – PVA)	17
2.2.1. Φυσικοί ξενιστές και συμπτώματα	17
2.2.2. Μετάδοση	17
2.2.3. Γεωγραφική κατανομή	17
2.2.4. Μορφολογία των ιοσωματιδίων	17
2.2.5. Βιοχημικά χαρακτηριστικά	17
2.3. Ο ιός του καρουλιάσματος των φύλλων (Potato leafroll virus – PLRV).....	17
2.3.1. Φυσικοί ξενιστές και συμπτώματα	17
2.3.2. Μετάδοση	18
2.3.3. Γεωγραφική κατανομή	18

	Σελ.
2.3.4. Μορφολογία των ιοσωματιδίων	18
2.3.5. Βιοχημικά χαρακτηριστικά	18
2.4. Ο ιός M της πατάτας (Potato Virus M – PVM)	19
2.4.1. Φυσιικοί ξενιστές και συμπτώματα	19
2.4.2. Μετάδοση	19
2.4.3. Γεωγραφική κατανομή	19
2.4.4. Μορφολογία των ιοσωματιδίων.....	19
2.4.5. Βιοχημικά χαρακτηριστικά	19
2.5. Ο ιός S της πατάτας (Potato Virus S – PVS)	19
2.5.1. Φυσιικοί ξενιστές και συμπτώματα	19
2.5.2. Μετάδοση	19
2.5.3. Γεωγραφική κατανομή	20
2.5.4. Μορφολογία των ιοσωματιδίων	20
2.5.5. Βιοχημικά χαρακτηριστικά	20
2.6. Ο ιός X της πατάτας (Potato Virus – PVX)	20
2.6.1. Φυσιικοί ξενιστές και συμπτώματα	20
2.6.2. Μετάδοση	20
2.6.3. Γεωγραφική κατανομή	20
2.6.4. Μορφολογία των ιοσωματιδίων	20
2.6.5. Βιοχημικά χαρακτηριστικά	21
3. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ	22
3.1. Γενεαλογική βελτίωση	22
3.2. Βοτανικός σπόρος (True Potato Seed – TPS)	22
3.3. Παραγωγή Πολλαπλασιαστικού Υλικού με κλωνική επιλογή ...	23
3.4. Παραγωγή Πολλαπλασιαστικού Υλικού με αξιοποίηση της <i>in vitro</i> τεχνολογίας	25
3.5. Παραγωγή απλοειδών φυτών πατάτας με καλλιέργεια ανθέρων <i>in vitro</i>	27
3.5.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την αντίδραση στην ανθηροκαλλιέργεια	28

	Σελ.
3.5.1.1 Γονότυπος	28
3.5.1.2 Στάδιο ανάπτυξης της γύρης	29
3.5.1.3 Θρεπτικό υπόστρωμα	29

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑ

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΙΑΠΛΟΕΙΔΩΝ ΦΥΤΩΝ ΠΑΤΑΤΑΣ ΜΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΝΘΗΡΩΝ <i>IN VITRO</i>	33
1. Υλικά και μέθοδοι	33
1.1. Φυτικό υλικό έναρξης	33
1.2. Προμεταχείριση και απολύμανση των “κλειστών ανθέων”	34
1.3. Θρεπτικό υπόστρωμα και εμφύτευση των ανθών	34
1.4. Αποτελέσματα	34

ΚΥΡΙΩΣ ΠΕΙΡΑΜΑ

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΓΑΜΕΤΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ ΠΑΤΑΤΑΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΦΥΛΗΣ Υ ^N ΤΟΥ ΙΟΥ Υ ΤΗΣ ΠΑΤΑΤΑΣ (PVY) ^N ..	37
Εισαγωγή	37
1. <i>In vitro</i> πολλαπλασιασμός των γαμετοκλωνικών φυτών πατάτας	39
1.1. Υλικά και μέθοδοι	39
1.1.1. Φυτικό υλικό έναρξης	39
1.1.2. <i>In vitro</i> καλλιέργεια του φυτικού υλικού έναρξης	40
1.1.3. Προετοιμασία του θρεπτικού υποστρώματος	43
1.1.4. Μεταφορά των φυταρίων από τις <i>in vitro</i> σε <i>in vivo</i> συνθήκες (εγκλιματισμός)	45
2. Προσδιορισμός του επιπέδου φυτοϋγείας των γαμετοκλωνικών φυτών έναντι της νεκρωτικής φυλής Υ ^N του ιού Υ της πατάτας (PVY) ^N	49
2.1. Arena test	49
2.2. Βιολογικός έλεγχος	51
2.3. Δοκιμή ELISA	52

	Σελ.
3. Αποτελέσματα	55
4. Συζήτηση – Συμπεράσματα	83
5. Γενικά συμπεράσματα	85
6. Βιβλιογραφία	86

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΤΑΤΑ (*SOLANUM TUBEROSUM L.*)

1.1. Κέντρα καταγωγής

Τα στοιχεία που αφορούν την καταγωγή της πατάτας διαφοροποιούνται στην πορεία του χρόνου με αποτέλεσμα να συγχέονται οι πληροφορίες, που αναφέρονται στην καταγωγή και εξελικτική πορεία της. Από τους περισσότερους συγγραφείς τόπος καταγωγής της πατάτας θεωρείται η οροσειρά των Άνδεων. Από τα διάφορα αρχαιολογικά ευρήματα προκύπτει ότι η πατάτα “εξημερώθηκε” από τους Ιθαγενείς της Ν. Αμερικής, στη συνέχεια διαδόθηκε (από την εποχή της άφιξης των Ισπανών 16^{ος} αιώνας) σ’ ολόκληρη την Αμερικάνικη ήπειρο. Αναφέρεται ότι, 6000 χρόνια πριν από την άφιξη των Ισπανών στην Νότια Αμερική, οι Ίνκας καλλιεργούσαν στα υψίπεδα των Άνδεων γονότυπους πατάτας του είδους *Solanum andigenum*.

Ανάμεσα στα 2000 βοτανικά είδη που ανήκουν στο γένος *Solanum* πάνω από 150 παράγουν εδώδιμους κονδύλους και πολλά από αυτά συναντώνται σε άγρια μορφή στα υψίπεδα της Κεντρικής και της Νότιας Αμερικής. Οι κόνδυλοι από τα είδη αυτά αποτελούσαν πολύτιμη τροφή για τους αυτόχθονες πληθυσμούς, οι οποίοι άρχισαν σιγά σιγά να επιλέγουν και να καλλιεργούν τα περισσότερο παραγωγικά και ανθεκτικά φυτά, έτσι επικράτησαν τα παρακάτω είδη:

- ❖ ***Solanum andigenum*** juz. et Buk. Προσαρμόζεται σε τροπικό περιβάλλον και απαιτεί 12 ώρες φωτοπερίοδο. Είναι το περισσότερο διαδομένο είδος στην οροσειρά των Άνδεων ανάμεσα στα γεωγραφικά πλάτη : 24⁰ Νότια και 10⁰ Βόρεια.
- ❖ ***Solanum tuberosum L.*** Κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης θεωρούνται οι εύκρατες περιοχές της Νότιας Χιλής, όπου το καλοκαίρι οι ημέρες είναι “μικρές”. Συναντάται περισσότερο ανάμεσα στα γεωγραφικά πλάτη : 45⁰ Νότια και 30⁰ Βόρεια.

Θα μπορούσε να θεωρηθεί, ότι στην πραγματικότητα πρόκειται για ένα μόνο είδος το *S. andigenum*, ενώ η χρήση του όρου *S. tuberosum* δείχνει την

εξέλιξη του *S. andigenum* σε περιοχές (με μακρά φωτοπερίοδο) της Νότιας Χιλής, αλλά και της Ευρώπης.

1.2. Εισαγωγή και διάδοση στην Ευρώπη και την Ελλάδα

Η πατάτα εμφανίσθηκε στην Ευρώπη κατά τη διάρκεια του τελευταίου τέταρτου του 16 ου αιώνα. Ο θρύλος έχει συνδέσει το Σερ Walter Raleigh και το Σερ Francis Drake με την εισαγωγή της πατάτας στην Αγγλία, όμως δεν υπάρχουν αποδείξεις, που να επιβεβαιώνουν αυτούς τους ισχυρισμούς.

Το 1565 – 1570 θεωρείτε ως ο πιθανότερος χρόνος άφιξης της πατάτας στην ηπειρωτική Ευρώπη. Ο Salaman (1937) παραθέτει στοιχεία για πατάτες που αγοράσθηκαν το 1573 στη Σεβίλλη, οι οποίες ενδεχόμενα να εισήχθηκαν στη Νότια Ισπανία γύρω στο 1570. Από την Ισπανία η πατάτα μεταφέρεται στην Ιταλία και στη συνέχεια εξαπλώθηκε σε όλη την Ευρώπη, όπου αρχικά αντιμετωπίζεται σαν βοτανική περιέργεια.

Η πατάτα εισήχθηκε στην Ιρλανδία τον XVIII αιώνα και ανέτρεψε τις διατροφικές συνήθειες του πληθυσμού προκαλώντας εντυπωσιακή δημογραφική αύξηση, που υπέστη στη συνέχεια τραγική αναχαίτιση (1845 – 1847) εξαιτίας της μειωμένης παραγωγής από επιδημία περονόσπορου, οδηγώντας τον πληθυσμό σε πείνα και απόγνωση.

Το 1827 (πριν από την άφιξη του Καποδίστρια στην Ελλάδα) η βουλή των Ελλήνων αποφάσισε και ενέκρινε την εισαγωγή της καλλιέργειας της πατάτας. Για να ενημερώσει μάλιστα τους καλλιεργητές έγινε ανατύπωση διαφημιστικού φυλλαδίου που είχε εκδοθεί στην Κέρκυρα το 1817 με τίτλο “καλλιέργεια των γεωμήλων”, δεδομένου ότι από το 1801 η Ιόνιος πολιτεία είχε ενδιαφερθεί για την εισαγωγή της πατάτας και στα Επτάνησα.

Η πατάτα εισήχθηκε στην Ελλάδα από τον Ιωάννη Καποδίστρια το 1828. Από την Αίγινα η καλλιέργεια της πατάτας άρχισε να επεκτείνεται και στην υπόλοιπη Ελλάδα. Ολόκληρος σχεδόν ο Ελληνικός γεωργικός πληθυσμός έδειξε εξαιρετικό ενδιαφέρον για την καλλιέργεια της πατάτας, μάλιστα πολλοί από αυτούς άρχισαν να ασχολούνται σχεδόν αποκλειστικά με το “νεόφερτο” αυτό είδος.

1.3. Ταξινόμηση της πατάτας

Η πατάτα ανήκει στην οικογένεια *Solanaceae* και στο γένος *Solanum*, το οποίο περιλαμβάνει περίπου 2000 είδη μεταξύ των οποίων και το *Solanum tuberosum*. Οι καλλιεργούμενες ποικιλίες της πατάτας ταξινομούνται ως εξής :

Υπογένος : *Pachystemonum*

Διαίρεση : *Tuberarium*

Υποδιαίρεση : *Hypersarthrum*

Σειρά : *Tuberosa Rydb*

Στη σειρά *Tuberosa* περιλαμβάνονται τα διπλοειδή (*Solanum ajanhiuri*, *S. gonicalyx*, *S. phureja*, *S. stenotomum*), τα τριπλοειδή (*S. x chaucha*, *S. x juzepczukii*) τα τετραπλοειδή (*S. tuberosum ssp. tuberosum*, *S. tuberosum ssp. andigena*) και το πενταπλοειδές (*S. x curtilobum*).

Οι ποικιλίες του *ssp. andigena*, σε σχέση με εκείνες του *ssp. tuberosum*, εμφανίζουν μικρότερα φύλλα και φυλλίδια, μικρότερους αλλά περισσότερους κονδύλους, οι οποίοι φέρουν βυθισμένους οφθαλμούς και κόκκινη επιδερμίδα. Όταν καλλιεργούνται σε συνθήκες μεγάλης φωτοπεριόδου (μεγάλα γεωγραφικά πλάτη) οι ανάγκες τους για βραχεία φωτοπερίοδο εκδηλώνεται με τη δημιουργία μακρύτερων στολόνων και οψίμηση της παραγωγής. Πράγματι το *ssp. andigena*, που κατάγεται από τις Κεντρικές Άνδεις (Νότια Βολιβία και Βόρειο Περού), όντας προσαρμοσμένο σε μικρές φωτοπεριόδους δεν είναι παραγωγικό στις μεγάλες φωτοπεριόδους που επικρατούν στην Ευρώπη κατά την διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου (καλοκαίρι).

1.4. Γενετική και κυττογενετική

Ο βασικός χρωμοσωμικός αριθμός του γένους *Solanum* είναι $x=12$. Ο αριθμός αυτός πολύ πιθανόν προήλθε από τον πραγματικό αριθμό βάσης $x=6$ (παρών σε μερικούς αρχέγονους προγόνους του) μετά από δευτερογενείς συνδυασμούς κατά τη διάρκεια της μείωσης σε διπλοειδή είδη.

Τα σωματικά χρωμοσώματα του *Solanum tuberosum* ($2n = 4x = 48$) ταξινομήθηκαν από το Swaminathan (1954).

1.5. Παραγωγή στον κόσμο, στην Ευρώπη και στην Ελλάδα

Η καλλιεργούμενη έκταση της πατάτας παγκοσμίως ανέρχεται στα 180.300.000 στρέμματα με ετήσια παραγωγή 288 εκατ. τόνους. Οι κορυφαίοι παραγωγοί πατάτας παγκοσμίως είναι η Ευρώπη, η πρώην USSR, η Ασία και η Βορειοκεντρική Αμερική.

Η παραγωγή στις χώρες της Ε. Ε. ανέρχεται σε 45 – 50 εκατ. τόνους, με μεγαλύτερους παραγωγούς τη Γερμανία (10 – 12 εκατ. τόνους), την Ολλανδία (7 εκατ. τόνους), τη Μεγάλη Βρετανία (7 εκατ. τόνους), τη Γαλλία (6 εκατ. τόνους) και την Ισπανία (4 – 5 εκατ. τόνους).

Στην Ελλάδα η καλλιεργούμενη έκταση της πατάτας το 1995 ήταν 412.901 στρέμματα με παραγόμενη ποσότητα 961.910 τόνους. Η Ελληνική παραγωγή αντιπροσωπεύει μόλις το 0,35% της παγκόσμιας παραγωγής (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Βασικά Ελληνικά γεωγραφικά διαμερίσματα σε παραγωγή πατάτας με τις αντίστοιχες καλλιεργούμενες εκτάσεις.

Γεωγραφικό διαμέρισμα	Παραγωγή (tn.)	Καλλιεργούμενη έκταση (στρ.)
Στερεά Ελλάδα και Εύβοια	100.110	67.305
Πελοπόννησος	355.461	161.806
Ιόνιοι Νήσοι	16.290	19.471
Ήπειρος	35.635	27.292
Θεσσαλία	29.965	15.080
Μακεδονία	148.826	61.838
Θράκη	62.779	26.001
Νήσοι Αιγαίου	48.049	31.363
Κρήτη	86.313	67.121

1.6. Ελληνικά κέντρα σποροπαραγωγής

Τα σημαντικότερα κέντρα σποροπαραγωγής είναι : της Χρυσοβίτσας (Γεωπονική σποροπαραγωγική επιχείρηση Ιωαννίνων), του Λασιθίου, της Τρίπολης και της Νάξου (για καλοκαιρινό πατατόσπορο).

Η παραγωγή των τριών κέντρων (Χρυσοβίτσας, Λασιθίου και Τρίπολης) είναι περίπου 1200 τόνοι ετησίως πιστοποιημένου πατατόσπορου

για εαρινή φύτευση. Το κέντρο Νάξου παράγει ετησίως τουλάχιστον 5.000 τόνους πιστοποιημένο πατατόσπορο για καλοκαιρινή φύτευση (Ιούλιος – Αύγουστος).

Σε όλα τα κέντρα η παραγωγή του πατατόσπορου γίνεται κάτω από τακτικό και αυστηρό έλεγχο των καλλιεργειών σε όλα τα στάδια (από τη φύτευση έως και την τελική συσκευασία) από αρμόδιες υπηρεσίες του Υπουργείου Γεωργίας (κεντρικές και περιφερειακές), προκειμένου να τηρηθούν όλα τα μέτρα που θα εξασφαλίσουν πατατόσπορο πολύ καλής ποιότητας.

Οι ετήσιες ανάγκες της Ελλάδας σε πατατόσπορο ανέρχονται σε 90.000 – 100.000 τόνους, αλλά μόνο το 30% είναι πιστοποιημένος. Η υπόλοιπη ποσότητα καλύπτεται από αναπολλαπλασιασμό του εισαγόμενου βασικού και από εισαγωγή πιστοποιημένου ή βασικού.

1.7. Σπουδαιότερες καλλιεργούμενες ποικιλίες στην Ελλάδα

Spunta

Η ποικιλία spunta είναι μεσοπρώιμη με πολύ υψηλές αποδόσεις. Οι κόνδυλοι είναι πολύ μεγάλοι, επιμήκεις με ομοιόμορφο μέγεθος, ελαφρά νεφροειδές σχήμα, ρηχά μάτια, κιτρινωπή επιδερμίδα, ελαφρά κίτρινη σάρκα.

Είναι ευαίσθητη στον περονόσπορο των φύλλων και των κονδύλων, μέτρια ανθεκτική στο καρούλιασμα των φύλλων και ανθεκτική στους ιούς X και Y.

Ανταπεξέρχεται ικανοποιητικά τις συνθήκες ζέστης και ξηρασίας και απαιτεί μικρές αποστάσεις φύτευσης. Η περίοδος λήθαργου είναι μικρή και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για φθινοπωρινή καλλιέργεια με εξαιρετικές αποδόσεις.

Kennebec

Η ποικιλία Kennebec προέρχεται από την Αγγλία, Δανία, Καναδά και Ολλανδία. Είναι μέσης πρωιμότητας έως όψιμη. Έχει καλή προσαρμοστικότητα και εξαιρετικές ιδιότητες αποθήκευσης. Το σχήμα των

κονδύλων είναι ελλειπτικό με επιφανειακά μάτια και λευκή σάρκα. Η φύτευση γίνεται σε μικρές αποστάσεις (15 – 25 cm μεταξύ των φυτών) ενώ το φύλλωμα πρέπει να καταστρέφεται, προκειμένου να παραχθούν μικροί κόνδυλοι.

Η Kennebec είναι ανθεκτική στους ιούς A και Y της πατάτας και στον όψιμο περονόσπορο στο φύλλωμα. Αντίθετα παρουσιάζει μέτρια ανθεκτικότητα στη μελανή σήψη, στην ξηρή σήψη από φουζάριο, στον καρκίνο της πατάτας και στους ιούς S και X. Είναι ευαίσθητη στον ιό του καρουλιάσματος των φύλλων, στον όψιμο περονόσπορο των κονδύλων, στη ριζοκτόνια στο βερτισίλιο.

2. ΣΠΟΥΔΑΙΟΤΕΡΕΣ ΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΤΗΣ ΠΑΤΑΤΑΣ

2.1. Ο ιός Y της πατάτας (Potato virus Y – PVY)

2.1.1. Φυσικοί ξενιστές και συμπτώματα

Ο PVY έχει μεγάλη ποικιλία ξενιστών και μεταδίδεται μηχανικά σε 120 περίπου φυτικά είδη 5 οικογενειών : *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Compositae*, *Leguminosae* και *Solanaceae*. Σημαντικοί ξενιστές του PVY είναι : *Capsicum spp.* (πιπεριά), *Lycopersicon esculentum* (τομάτα), *Nicotiana spp.* (καπνός), *Physalis floridana*, *Solanum spp.* (αγριοντοματιά), και η πατάτα.

Τα συμπτώματα της αρχικής μόλυνσης εμφανίζονται με στίγματα, κιτρίνισμα, ριτίδιασμα και νέκρωση των φύλλων, ενώ εκείνα της δευτερεύουσας (μολυσμένος κόνδυλος) είναι νανισμός και εύθραυστο φύλλωμα. Η έκφραση των συμπτωμάτων εξαρτάται από τη φυλή του ιού, την καλλιεργούμενη ποικιλία πατάτας, την ηλικία κατά τη μόλυνση και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα συμπτώματα είναι εντονότερα και σοβαρότερα σε περίπτωση διπλής μόλυνσης (συνδιασμός των PVY και PVX της πατάτας), όπου προκύπτει το λεγόμενο “ τραχύ μωσαϊκό ”. Μέρος μόνο των κονδύλων μολύνεται στην αρχική μόλυνση, επειδή οι μικρότεροι κόνδυλοι (< 30 gr) σε ποσοστό περίπου 50 % δεν φιλοξενούν τον ιό.

2.1.2. Μετάδοση

Ο PVY μεταδίδεται μηχανικά ή με χυμό. Ανήκει στο γένος *Potyvirus* και μεταδίδεται με αφίδες (μη έμμοнос τρόπος) (*Hemiptera: Aphididae*).

Οι De Bokx και Huttinga (1981) αναφέρουν περίπου 25 είδη αφίδων φορείς του ιού Y της πατάτας. Άλλες βιβλιογραφικές αναφορές εμφανίζουν περίπου 50 είδη αφίδων ως φορείς του PVY. Οι αφίδες μολύνονται με τον PVY σε λιγότερο από 5 δευτερόλεπτα, ενώ η αποτελεσματικότητα μετάδοσης διαρκεί από 10 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό τροφικής δραστηριότητας. Αξίζει να σημειωθεί ότι όταν μια αφίδα τρέφεται για περισσότερο από 5 έως 10 λεπτά παρατηρείται μειωμένη μεταδοτικότητα. Σύμφωνα με τον Bradley (1953), μόνο

οι αφίδες που κάνουν σύντομη μύζηση μεταδίδουν αποτελεσματικά τον PVY. Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι οι πεινασμένες αφίδες μεταδίδουν αποτελεσματικότερα τον PVY. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στο γεγονός ότι οι πεινασμένες αφίδες τσιμπούν με μεγαλύτερη συχνότητα σε σχέση με τις μη πεινασμένες, όταν μετακινούνται από τους ξενιστές στα φυτά δείκτες.

Η συχνότητα μετάδοσης ποικίλει ανάμεσα στα είδη των αφίδων. Η πράσινη αφίδα του ροδάκινου *Myzus persicae* είναι ο πιο ικανός φορέας του ιού Y της πατάτας, αλλά η ικανότητα μετάδοσης κυμαίνεται από 8% έως 64%. Άλλα είδη που αποικίζουν την πατάτα και μεταδίδουν τον PVY είναι: *Aphis nasturtii* (31%), *Aulacorthum solani* (4%), *Macrosiphum euphorbiae* (2-45%).

Είδη αφίδων που δεν αποικίζουν την πατάτα και μεταδίδουν τον PVY σε μεγάλο ποσοστό είναι : *Myzus certus* μεταδίδει τον ιό με μεγάλη ικανότητα (54%) στον Καναδά, ενώ η *Brachycaudus helichrysi* είναι ένας αποτελεσματικός φορέας (15-34%) στην Ευρώπη. Άλλες αφίδες που δεν αποικίζουν την πατάτα και μεταδίδουν τον PVY σε σχετικά μικρά ποσοστά είναι : *Acyrtosiphon pisum* (0-12%), *Aphis citricola* (6%), *Aphis fabae* (0-12%), *Capitophorus elaeagni* (2%), *Ropalosiphum maidis* (2%), *Ropalosiphum padi* (0-11%), *Schizaphis graminum* (4-5%), *Sitobion avenae* (0-2%).

Η διαφορά στην ικανότητα μετάδοσης του PVY ανάμεσα στα είδη των αφίδων οφείλεται στη συμπεριφορά τους αλλά και σε φυσικούς παράγοντες.

Σχετικά με τη συμπεριφορά : Η *M. euphorbiae* μεταδίδει αποτελεσματικότερα τον PVY στον καπνό παρά στην πατάτα, ενδεχόμενα να τσιμπάει συχνότερα και για μικρότερη διάρκεια τον καπνό. Η *B. helichrysi* συνήθως κάνει σύντομα τσιμπήματα (0 – 20 δευτερόλεπτα) σε φυτά καπνού μολυσμένα με τον PVY με μεταδοτικότητα 15%, ενώ στην *Drepanosiphum platanoidis* τα τσιμπήματα έχουν μεγαλύτερη διάρκεια (περισσότερο από 1 λεπτό) και η μεταδοτικότητα είναι περίπου 1%.

Όσο αφορά τους φυσικούς παράγοντες, ενδεχόμενα να σχετίζονται με την αδρανοποίηση των ισωματίων στο σίελο του φορέα ή στις διαφορετικές θέσεις προσκόλλησης των ισωματίων στο εσωτερικό τοίχωμα του σιλιέτου και του οισοφάγου των αφίδων. Η μετάδοση του PVY εξαρτάται από την

παρουσία ενός βοηθητικού συστατικού στο χυμό του φυτού. Το βοηθητικό συστατικό σχετίζεται με την προσκόλληση των ιοσωματίων στα τοιχώματα των στοματικών μορίων των αφίδων.

Επιπλέον στα διαφορετικά στάδια των αφίδων εμφανίζεται διαφορετικό επίπεδο αποτελεσματικότητας. Οι Singh et al (1983) και Upreti και Nagaich (1971) αναφέρουν ότι οι νύμφες και τα ενήλικα άπτερα στη *M. persicae* έχουν μεγαλύτερη ικανότητα μετάδοσης σε σχέση με τα πτερωτά ενήλικα. Αντίθετα ο Stevenson (1959) δεν βρήκε ανάλογη διαφορά μεταξύ των σταδίων ανάπτυξης της *M. persicae*. Η μετάδοση από αφίδες επηρεάζεται και από περιβαλλοντικούς και άλλους παράγοντες. Οι Singh et al (1988) αναφέρουν αύξηση της μετάδοσης του PVY σε υψηλότερες θερμοκρασίες και υψηλή υγρασία (μεγαλύτερη από 80%) για *M. persicae* και *A. gossypii*. Η ικανότητα μετάδοσης της *M. persicae* σχετίζεται με τη συγκέντρωση του ιού στο φυτό ξενιστή.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι, η ικανότητα μετάδοσης του PVY από διαφορετικά είδη αφίδων εξαρτάται από φυσικούς παράγοντες, τη συμπεριφορά των αφίδων, τη γενετική ποικιλότητα, τα στάδια ανάπτυξης των αφίδων, καθώς επίσης και το περιβάλλον στο οποίο δρουν οι αφίδες.

2.1.3. Γεωγραφική κατανομή

Ο ιός Y της πατάτας (PVY) έχει τρεις φυλές. Η φυλή Y^o με παγκόσμια διάδοση. Η φυλή Y^N συναντάται κυρίως στην Ευρώπη αλλά και σε διάφορα μέρη της Αφρικής και της Νότιας Αμερικής. Η φυλή Y^C βρέθηκε στην Αυστραλία την Ινδία και σε ορισμένες περιοχές της Αγγλίας και της Ηπειρωτικής Ευρώπης.

2.1.4. Μορφολογία των ιοσωματιδίων

Μορφολογικά είναι εύκαμπτοι ραβδίσκοι μήκους περίπου 720-900 nm και εύρους 11nm.

2.1.5. Βιοχημικά χαρακτηριστικά

Το γονιδίωμα του αποτελείται από ένα μονόκλωνο μόριο RNA. Περιέχει νουκλεϊκό οξύ (5,4%-6,4%) και πρωτεΐνη (93,6% - 94,6%).

2.2. Ο ιός A της πατάτας (Potato Virus A – PVA)

2.2.1. Φυσικοί ξενιστές και συμπτώματα

Solanum tuberosum, προκαλεί ήπιο μωσαϊκό, τραχιά επιφάνεια των φύλλων με κυματοειδές περίγραμμα.

Πατάτες μολυσμένες με τον ιό A σε συνδυασμό με τους ιούς της πατάτας X και Y εμφάνισαν ριτίδισμα .

2.2.2. Μετάδοση

Μεταδίδεται με αφίδες, *Aphis frangulae*, *A. nasturtii*, *Myzus persicae*, *Aphididae*, με μη έμμοιο τρόπο. Δεν μεταδίδεται με βοτανικό σπόρο.

2.2.3. Γεωγραφική κατανομή

Πιθανώς έχει παγκόσμια διάδοση (στις περισσότερες περιοχές καλλιέργειας της πατάτας).

2.2.4. Μορφολογία των ιοσωματιδίων

Είναι νηματοειδή εύκαμπτα, με καθαρά τυπικό μήκος 730 nm και εύρος 11 nm .

2.2.5. Βιοχημικά χαρακτηριστικά

Το γονιδίωμα του αποτελείται από ένα μονόκλωνο μόριο RNA.

2.3. Ο ιός του καρουλιάσματος των φύλλων (Potato Leafroll Virus – PLRV)

2.3.1. Φυσικοί ξενιστές και συμπτώματα

1. *Solanum tuberosum ssp. tuberosum*, ωχρότης ή κοκκίνισμα των ακραίων φύλλων, τα οποία συστρέφονται και ανορθώνονται. Τα

φυτά που προέρχονται από μολυσμένους κονδύλους είναι νάνα και τα φύλλα καρουλιάζουν (αρχικά τα γηραιότερα).

2. *Solanum tuberosum ssp. andigena* στη Νότια Αμερική, προκαλεί νανισμό και περιμετρικό κιτρίνισμα των ακραίων φύλλων.
3. *Lycopersicon esculentum*, προκαλεί νανισμό των φυτών, περιμετρικό κιτρίνισμα, κατσάρωμα των φυλλαρίων, και νέκρωση των ανθέων πριν ακόμη ανοίξουν.

2.3.2. Μετάδοση

Μεταδίδεται με αφίδες. Το *Myzus persicae* θεωρείται ο πλέον αποτελεσματικός φορέας μετάδοσης. Το *Macrosiphum euphorbiae* καταγράφεται ως λιγότερο αποτελεσματικό. Η μετάδοση γίνεται με έμμοιο τρόπο. Δεν μεταδίδεται μηχανικά, ούτε με το σπόρο, αλλά ούτε με τη γύρη.

2.3.3. Γεωγραφική κατανομή

Συναντάται σχεδόν σε όλες τις περιοχές του κόσμου, όπου καλλιεργείται η πατάτα. Προσβολές της τομάτας έχουν αναφερθεί από τη Βόρεια Αμερική (Alstatt and Ivanoff 1945), Νότια Αμερική (Costa 1949) και Australasia (Sutton 1955), αλλά δεν έχει αποδειχθεί ότι όλες προκλήθηκαν από τις φυλές του ιού του καρουλιάσματος των φύλλων της πατάτας.

2.3.4. Μορφολογία των ιοσωματιδίων

Είναι σφαιρικά με διάμετρο 24 nm .

2.3.5. Βιοχημικά χαρακτηριστικά

Περιέχουν : νουκλεϊκό οξύ 30% και πρωτεΐνη 70%.

Το γονιδίωμα αποτελείται από ένα μονόκλωνο μόριο RNA.

2.4. Ο ιός M της πατάτας (Potato Virus M – PVM)

2.4.1. Φυσικοί ξενιστές και συμπτώματα

Solanum tuberosum, τα συμπτώματα ποικίλουν από πολύ ήπια έως αρκετά έντονα. Προκαλεί ποικιλοχλώρωση, μωσαϊκό, πτύχωση, καρούλιασμα των φύλλων και νανισμό των βλαστών.

2.4.2. Μετάδοση

Μεταδίδεται με αφίδες με τα είδη (*Myzus persicae*, *Aphis frangulae*, *A. nasturtii* και *Macrosiphum euphorbiae*) και με μη έμμοιο τρόπο. Ο ιός μεταδίδεται μηχανικά, αλλά δεν μεταδίδεται με το σπόρο και τη γύρη.

2.4.3. Γεωγραφική κατανομή

Πιθανώς έχει παγκόσμια διάδοση (στις καλλιεργούμενες ποικιλίες πατάτας).

2.4.4. Μορφολογία των ιοσωματιδίων

Είναι νηματοειδή (συνήθως ευθύγραμμα), με τυπικό μήκος 650nm και εύρος 12nm.

2.4.5. Βιοχημικά χαρακτηριστικά

Περιέχει νουκλεϊκό οξύ 6%. Το γονιδίωμα αποτελείται από μονόκλωνο μόριο RNA.

2.5. Ο ιός S της πατάτας (Potato Virus S – PVS)

2.5.1. Φυσικοί ξενιστές και συμπτώματα

Solanum tuberosum, προκαλεί λίγα ή καθόλου συμπτώματα, αλλά μειώνει την παραγωγή κονδύλων πάνω από 20%.

2.5.2. Μετάδοση

Μεταδίδεται με το είδος *Myzus persicae*, με μη έμμοιο τρόπο. Η μετάδοση μπορεί να γίνει και μηχανικά, ενώ δεν μεταδίδεται με το σπόρο.

2.5.3. Γεωγραφική κατανομή

Πιθανώς έχει παγκόσμια διάδοση (σε καλλιεργούμενες ποικιλίες πατάτας).

2.5.4. Μορφολογία των ιοσωματίων

Είναι νηματοιειδή (συνήθως ευθύγραμμο) με τυπικό μήκος 650nm και εύρος 12nm.

2.5.5. Βιοχημικά χαρακτηριστικά

Μονόκλωνο RNA αποτελούμενο από 7,5kb.

2.6. Ο ιός X της πατάτας (Potato Virus X – PVX)

2.6.1. Φυσικοί ξενιστές και συμπτώματα

1. *Solanum tuberosum*, τα συμπτώματα ποικίλλουν, κάποιες φυλές δεν εμφανίζουν συμπτώματα ενώ άλλες προκαλούν νεκρωτική ράβδωση.
2. *Brassica rapa*, ήπιο μωσαϊκό με ποικιλοχλώρωση, παραμόρφωση των φύλλων και νανισμός του φυτού.

2.6.2. Μετάδοση

Ο ιός μεταδίδεται μηχανικά και με την επαφή μεταξύ των φυτών. Δεν μεταδίδεται από σπόρο και γύρη.

2.6.3. Γεωγραφική κατανομή

Έχει παγκόσμια διάδοση (σε περιοχές καλλιέργειας της πατάτας).

2.6.4. Μορφολογία των ιοσωματιδίων

Είναι νηματοιειδή (συνήθως εύκαμπτα) με τυπικό μήκος 515nm και εύρος 13nm.

2.6.5. Βιοχημικά χαρακτηριστικά

Περιέχουν : νουκλεϊκό οξύ 6%, πρωτεΐνη 94%, λιπίδια 0%. Το γονιδίωμα τους αποτελείται από ένα μονόκλωνο μόριο RNA.

3. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ

Σκοπός της γενετικής βελτίωσης της πατάτας είναι η δημιουργία ατόμων με υψηλή παραγωγικότητα, ανθεκτικότητα σε εχθρούς και ασθένειες και καλή προσαρμοστικότητα σε διαφορετικά περιβάλλοντα.

Η βελτίωση της πατάτας επιτυγχάνεται όχι μόνο με κλασικές (διασταύρωση, κλωνική επιλογή, μεταλλάξεις), αλλά και με βιοτεχνολογικές μεθόδους (σωματική παραλλακτικότητα, δημιουργία απλοειδών και χρωματοσωματικός διπλασιασμός).

3.1. Γενεαλογική βελτίωση

Η γενεαλογική βελτίωση της πατάτας βασίζεται στη διασταύρωση, με την οποία είναι δυνατόν να ενσωματώσουμε σε ένα άτομο γόνους που ελέγχουν αξιόλογα ποιοτικά κυρίως χαρακτηριστικά.

Οι πρώτες τεχνητές διασταυρώσεις στην πατάτα φαίνεται ότι πραγματοποιήθηκαν στις αρχές του 18^{ου} αιώνα. Όμως στην Ευρώπη οι διασταυρώσεις πατάτας για τη δημιουργία νέων ποικιλιών απέκτησαν μεγάλη σπουδαιότητα μετά από τις επιδημίες του περονόσπορου το 1845, καθώς επίσης και μετά το 1915 όταν αναγνωρίσθηκε η σπουδαιότητα της ανοσίας έναντι του μύκητα *Synchytrium endobioticum* (Howard 1970). Πρακτικά όλες οι καλλιεργούμενες ποικιλίες πατάτας έχουν προκύψει από προγράμματα διασταύρωσης.

Τις τελευταίες δεκαετίες οι διασταυρώσεις γίνονται μεταξύ ποικιλιών της ομάδας *Tuberosum* ή με ποικιλίες της ομάδας *Andigena* για την εισαγωγή επιπλέον παραλλακτικότητας ή με άγρια είδη του γένους *Solanum* (που παράγουν κονδύλους) προκειμένου να αξιοποιηθεί το μεγάλο εύρος παραλλακτικότητας τους.

3.2. Βοτανικός σπόρος (True Potato Seed - TPS)

Βασικός στόχος κάθε διασταύρωσης είναι η λήψη βοτανικού σπόρου (True Potato Seed - TPS). Στις ανεπτυγμένες χώρες ο βοτανικός σπόρος

αξιοποιείται κυρίως σε προγράμματα γενετικής βελτίωσης, ενώ στις αναπτυσσόμενες χρησιμοποιείται για την παραγωγή πατάτας για κατανάλωση. Αξίζει να σημειωθεί ότι το διεθνές κέντρο έρευνας για την πατάτα (International Potato Center – CIP), που εδρεύει στη Lima του Περού εδώ και αρκετά χρόνια προωθεί την έρευνα προς αυτή την κατεύθυνση.

Η αξιοποίηση του βοτανικού σπόρου για παραγωγή πατάτας για κατανάλωση παρουσιάζει τα παρακάτω πλεονεκτήματα :

1. Κανένας ιός της πατάτας δεν μεταδίδεται με τον βοτανικό σπόρο (TPS) εκτός του ιοειδούς των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας (potato spindle tuber viroid – PSTV).
2. Ευκολότερη μεταφορά και αποθήκευση, καθώς επίσης και μικρότερο κόστος σε σχέση με εκείνο των κονδύλων.
3. Για την καλλιέργεια ενός στρέμματος χρησιμοποιούνται περίπου 8 gr σπόρου, ενώ για την ίδια έκταση απαιτούνται περίπου 200 kg κονδύλων.

Τα βασικά μειονεκτήματα που προκύπτουν από τη χρήση του βοτανικού σπόρου στην καλλιέργεια πατάτας είναι :

- ❖ Μικροί και ανομοιόμορφοι κόνδυλοι.
- ❖ Η απόδοση είναι μικρότερη σε σχέση με αυτή που παίρνουμε από την καλλιέργεια κονδύλων.
- ❖ Η διαδικασία παραγωγής πατάτας κατανάλωσης με βοτανικό σπόρο είναι χρονοβόρα και έχει υψηλό κόστος (χρήση σπορείων, μεταφυτεύσεις κ. α.).

3.3. Παραγωγή Πολλαπλασιαστικού Υλικού με κλωνική επιλογή

Στόχος ενός βελτιωτικού προγράμματος πατάτας με κλωνική επιλογή είναι αρχικά **η απόκτηση υγιών μητρικών φυτών** με επιλογή. Σε μία καλλιέργεια επισημαίνονται φυτά με επιθυμητά χαρακτηριστικά (ανθεκτικότητα σε εχθρούς και ασθένειες, απόδοση κ. α.). Στη συνέχεια γίνεται η συγκομιδή και οι κόνδυλοι από κάθε μητρικό φυτό (mother or basic plants) φυλάσσονται χωριστά.

Οι κόνδυλοι κάθε μητρικού φυτού φυτεύονται χωριστά σε γραμμές ή πειραματικά τεμάχια δίνοντας τον **κλώνο ή την οικογένεια του 1^{ου} έτους**. Εάν σε κάποιο πειραματικό τεμάχιο εμφανιστεί έστω και ένα φυτό με ιολογικό πρόβλημα απομακρύνεται ολόκληρος ο κλώνος. Οι επιλεγμένοι κλώνοι φυτεύονται το 2^ο έτος και ακολουθείται η προαναφερθείσα διαδικασία, δηλαδή απομακρύνονται οι κλώνοι που εμφανίζουν άρρωστα ή εκτός τύπου φυτά. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για 5 χρόνια στη διάρκεια των οποίων παράγονται διαδοχικά κλώνοι 2^{ου}, 3^{ου}, 4^{ου} και 5^{ου} έτους. Μετά από τα πέντε χρόνια πολλαπλασιασμού από τους υγιείς κλώνους προκύπτει μια κατηγορία πολλαπλασιαστικού υλικού που ονομάζεται σπόρος Superelite ή elite (SE ή E).

Η προαναφερόμενη κατηγορία σπόρου (κλώνοι 5^{ου} έτους) παράγεται σε μικρές ποσότητες από τα ειδικά κέντρα σποροπαραγωγής, στη συνέχεια διατίθεται σε ιδιωτικούς φορείς ή συνεταιρισμούς σαν μητρικό υλικό με σκοπό την παραγωγή **βασικού σπόρου**.

Τέλος η παραγωγή του **πιστοποιημένου σπόρου** γίνεται από ειδικά κέντρα σποροπαραγωγής, είτε με τον πολλαπλασιασμό του βασικού σπόρου, είτε με τον πολλαπλασιασμό του πιστοποιημένου 1^{ης} αναπαραγωγής με αποτέλεσμα να προκύψει ο **πιστοποιημένος 2^{ης} αναπαραγωγής**.

Σύμφωνα με τους κανονισμούς της Ε. Ε. οι ελάχιστες προϋποθέσεις τις οποίες πρέπει να ικανοποιεί ο πιστοποιημένος πατατόσπορος είναι :

- ❖ κατά τον επίσημο καλλιεργητικό έλεγχο ο αριθμός των φυτών που έχουν προσβληθεί από μελάνωση δεν πρέπει να υπερβαίνει σε ποσοστό το 4%.
- ❖ Στους απευθείας απογόνους το ποσοστό φυτών που δεν είναι σύμφωνο με την ποικιλία δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,5% και το ποσοστό σε αριθμό φυτών ξένων ποικιλιών το 0,2%.
- ❖ Στους απευθείας απογόνους το ποσοστό σε αριθμό φυτών που παρουσιάζουν συμπτώματα του ιού του καρουλιάσματος των φύλλων της πατάτας (potato leafroll virus- PLRV) και του ιού Y της πατάτας (potato Y virus – PVY) δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10%.

- ❖ Επίσης ο αγρός παραγωγής δεν πρέπει να είναι μολυσμένος από *Globodera rostochiensis* Woll, καθώς επίσης και από τα *Synchytrium endobioticum* και *Corynebacterium sepedonicum*.

3.4. Παραγωγή Πολλαπλασιαστικού Υλικού με αξιοποίηση της *in vitro* τεχνολογίας

Η αξιοποίηση της *in vitro* τεχνολογίας στην παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού καθώς και οι εξελίξεις στον τομέα της διάγνωσης των ιολογικών ασθενειών επέτρεψαν την παραγωγή μεγάλου αριθμού φυταρίων (σε σύντομο χρόνο), τα οποία καλλιεργούμενα σε προστατευμένο περιβάλλον (εντομοστεγείς κατασκευές) έδωσαν την δυνατότητα παραγωγής απολύτως υγιών κονδύλων.

Τα στάδια που ακολουθούνται, προκειμένου να παραχθεί υγιές πολλαπλασιαστικό υλικό πατάτας είναι :

- 1. Δημιουργία υγιούς φυτικού υλικού έναρξης.** Αρχικά ένας ή λίγοι κόνδυλοι από την ποικιλία με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά φυτεύονται σε γλάστρες που περιέχουν απολυμασμένο υπόστρωμα και μεταφέρονται σε θερμοκήπιο για να ακολουθήσει η βλάστηση. Μετά την ανάπτυξη των βλαστών γίνεται λήψη τμημάτων τους και φύλλων ώστε να πραγματοποιηθεί έλεγχος με τη δοκιμή ELISA. Ο έλεγχος πραγματοποιείται σε όλους τους βλαστούς κάθε κονδύλου για τυχόν παρουσία συγκεκριμένων παθογόνων, ιών και βακτηρίων. Στη συνέχεια οι υγιείς κόνδυλοι που προέκυψαν από τη δοκιμή ELISA υφίστανται βιολογικό έλεγχο (δοκιμές μετάδοσης σε ποώδεις φυτοδείκτες) για την ανίχνευση ιολογικών ασθενειών που δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν ορολογικά επειδή δεν υπάρχει το ανάλογο διαγνωστικό σκεύασμα ή προκαλούνται από φυλές που δεν ανιχνεύονται με την δοκιμή ELISA. Η δοκιμή ELISA επαναλαμβάνεται μετά από 10 – 15 ημέρες. Στη συνέχεια από τους υγιείς κονδύλους που προέκυψαν από τους παραπάνω ελέγχους λαμβάνονται έκφυτα για την πραγματοποίηση του μικροπολλαπλασιασμού *in vitro*. Αν αποδειχθεί ότι όλοι οι κόνδυλοι της ποικιλίας είναι μολυσμένοι καταφεύγουμε στην εξυγίανση τους, αξιοποιώντας τεχνικές όπως

θερμοθεραπεία, χημειοθεραπεία και καλλιέργεια μεριστώματος *in vitro* (Αυγελής & Γραμματικάκη 1994).

2. **Πολλαπλασιασμός *in vitro***. Τα έκφυτα που λαμβάνονται από τους υγιείς κονδύλους πολλαπλασιάζονται *in vitro* για τη δημιουργία μικρόφυτων (microplants), μικροκόνδυλων (microtubers) και μινικονδύλων (minitubers) (Γραμματικάκη, 1999).

α . Μικρόφυτα. Για την δημιουργία μικροφύτων λαμβάνονται τμήματα του βλαστού ή των φύτρων από τον αρχικό υγιή κόνδυλο, που αποτελούνται από ένα κόμβο με τον μασχαλιαίο οφθαλμό. Ακολουθεί απολύμανση και εμφύτευση τους σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα. Μετά την έκπτυξη του μασχαλιαίου οφθαλμού και την εξέλιξη του σε βλαστό με τέσσερις έως πέντε κόμβους ακολουθεί ο μικροπολλαπλασιασμός του. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται έως ότου να αποκτηθεί ο απαιτούμενος αριθμός μικροφύτων.

Τα μικρόφυτα στη συνέχεια εγκλιματίζονται και μεταφέρονται σε εντομοστεγείς κατασκευές ώστε να προστατεύονται από τις αφίδες που είναι φορείς ιών. Ο εγκλιματισμός των μικροφύτων πραγματοποιείται σε θάλαμο με ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας. Στη συνέχεια σε εντομοστεγές θερμοκήπιο πραγματοποιείται μεταφύτευση των φυτών στο έδαφος το οποίο έχει απολυμανθεί κατάλληλα. Το έδαφος καλύπτεται με αδιαφανές πλαστικό και τα φυτά δέχονται ψεκασμό από μυκητοκτόνο και αφιδοκτόνο προκειμένου να εξαλειφθούν τυχόν αφίδες που υπάρχουν στα φυτά.

β . Μικροκόνδυλοι. Τα αναπαραγωγικά στοιχεία που λαμβάνονται στην *in vitro* καλλιέργεια των μικροφύτων είναι οι μικροκόνδυλοι, η παραγωγή των οποίων διεγείρεται από την παρουσία συγκεκριμένων ορμονών στο θρεπτικό υπόστρωμα. Το βάρος των μικροκόνδυλων κυμαίνεται από 20 έως 700 mg και η διάμετρος τους μεταξύ 3 και 10 mm. Η χρήση τους στην παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού πατάτας βοηθάει στην απλοποίηση των διαδικασιών μεταφοράς του υλικού από το εργαστήριο στον αγρό λόγω του μικρού τους όγκου, καθώς και την επίτευξη καλύτερης απόδοσης από εκείνη των μικροφύτων. Η δημιουργία των

μικροκόνδυλων επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες όπως τη σακχαρόζη, το άζωτο, τη φωτοπερίοδο και την ποικιλία.

γ . Μινικόνδυλοι. Ως μινικόνδυλοι χαρακτηρίζονται οι κόνδυλοι διαμέτρου 6 – 15 mm και βάρους 1- 2 gr που παράγονται *in vitro* από μικρόφυτα ή μικροκόνδυλους που καλλιεργούνται σε θερμοκήπιο. Η παραγωγή τους μπορεί να αυξηθεί μέχρι και 250% αφού από τα ίδια φυτά μπορούν να πραγματοποιηθούν τρεις διαδοχικές συλλογές των κονδύλων με μεταφύτευση των φυτών μετά από κάθε συλλογή σε νέο υπόστρωμα τύρφης και περλίτη.

Μετά από τους διαδοχικούς αυτούς πολλαπλασιασμούς οι μινικόνδυλοι που θα παραχθούν θα αποτελέσουν το βασικό πολλαπλασιαστικό υλικό.

3.5. Παραγωγή απλοειδών φυτών πατάτας με καλλιέργεια ανθήρων *in vitro*

Τα απλοειδή φυτά (με η αριθμό χρωμοσωμάτων), αποκτούν μεγάλη σπουδαιότητα σε προγράμματα γενετικής βελτίωσης των φυτών και μπορούν να δημιουργηθούν τυχαία στη φύση (κάποια διαταραχή στην ανάπτυξη του αρσενικού ή του θηλυκού γαμετόφυτου), ή με την αξιοποίηση βιοτεχνολογικών μεθόδων. Οι μέθοδοι που κυρίως χρησιμοποιούνται για την πρόκληση απλοειδίας είναι η καλλιέργεια ανθήρων, ανώριμων γυρεοκόκκων ή και απομονωμένων ωαρίων σε συνθήκες *in vitro*.

Οι φυσιολογικοί τρόποι με τους οποίους μπορεί να προκληθεί η παραγωγή απλοειδών είναι τρεις (Καλτσίκης 1989). Από ένα μη γονιμοποιημένο ωκύτταρο (παρθενογένεση). Από τον αρσενικό γαμέτη ή το σπερματικό πυρήνα (ανδρογένεση). Από οποιοδήποτε απλοειδές κύτταρο του εμβρυόσακου (εκτός από το ωκύτταρο) και κυρίως από τα κύτταρα συνεργίδες ή αντίποδες (απογαμετία).

Πρώτοι οι Guha & Maheshwari (1964, 1966) πειραματιζόμενοι στο είδος *Datura innoxia* δημιούργησαν τις προϋποθέσεις για την παραγωγή απλοειδών φυτών με καλλιέργεια γυρεοκόκκων σε συνθήκες *in vitro*. Στην πατάτα η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε αρχικά από τους Irikura & Sakaguchi (1972) αλλά χωρίς επιτυχία. Ακολούθησαν αρκετές ερευνητικές εργασίες με

περιορισμένη επιτυχία. Τελικά οι Jacobsen & Sorogy (1978) χρησιμοποιώντας τους ανθήρες του *Solanum tuberosum* παρήγαγαν ένα μεγάλο αριθμό εμβρυοειδών (χωρίς τη δημιουργία κάλου) και τελικά μονοαπλοειδή φυτά.

Οι σημαντικότερες μεθοδολογίες που επιτρέπουν τη δημιουργία απλοειδών από καλλιέργεια γυρεοκόκκων είναι οι εξής :

- καλλιέργεια ανθέρων με εμφύτευση σε στερεό ή με επίπλευση σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα.
- Καλλιέργεια ολόκληρης της ταξιανθίας σε ανακινούμενο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα.
- Καλλιέργεια απομονωμένων μικροσπορίων που προέρχονται από άρτι συγκομισθέντες ή προκαλλιεργούμενους ανθήρες ή από ανθήρες που “ωριμάζουν” σε υγρό υπόστρωμα.

Μετά την *in vitro* καλλιέργεια των ανθέρων οι πυρήνες των μικροσπορίων υποκινούνται σε διαίρεση, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα πολυκυτταρικό σώμα, το οποίο σπάζει το εξωτερικό τοίχωμα του γυρεόκοκκου (exosporium) και απελευθερώνεται εξελισσόμενο σε εμβρυοειδές.

Τα εμβρυοειδή σχηματίζονται με :

- ❖ Άμεση ανδρογένεση (σχηματισμός απευθείας από τα μικροσπόρια), με αποτέλεσμα να εξελίσσονται απευθείας σε φυτάρια.
- ❖ Οργανογένεση (σχηματισμός απλοειδούς κάλου, πρόκληση οργανογένεσης και επακόλουθη μορφογένεση).

3.5.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την αντίδραση στην ανθηροκαλλιέργεια

3.5.1.1. Γονότυπος

Βασικός παράγοντας για την επιτυχή παραγωγή απλοειδών φυτών με καλλιέργεια ανθέρων *in vitro* είναι το ίδιο το φυτό. Πράγματι διαφορετικά φυτικά είδη καθώς επίσης και ποικιλίες μέσα στο ίδιο είδος εμφανίζουν διαφορετική αντίδραση στην ανθηροκαλλιέργεια.

Αρκετοί γονότυποι δεν μπορούν να δώσουν βιώσιμα έμβρυα ή φυτάρια, γεγονός που ενδεχόμενα οφείλεται στην παρουσία γονιδίων, τα οποία είναι θνησιγενή στα μονοαπλοειδή ή σε ομοζυγωτική κατάσταση στα διπλοειδή, αλλά καθόλου στα ετεροζυγωτικά διπλοειδή φυτά “δωρητές. Επιπλέον οι διαφορές αντίδρασης των γονότυπων μπορεί να οφείλονται μερικώς στη διαφορετική ευαισθησία τους έναντι των συστατικών του θρεπτικού υποστρώματος και κυρίως των ρυθμιστών αύξησης.

3.5.1.2. Στάδιο ανάπτυξης της γύρης

Κρίνεται ότι το μονοπύρρηνο στάδιο είναι το καταλληλότερο για την *in vitro* καλλιέργεια ανθέρων και μάλιστα όταν τα μικροσπόρια βρίσκονται πριν ή κατά τη διάρκεια της πρώτης μίτωσης.

Η αντίδραση αυτή, ενδεχόμενα να οφείλεται στο γεγονός ότι, η μονοπύρρηνη γύρη δεν έχει φθάσει στο τελευταίο στάδιο διαφοροποίησης (όπως είναι το διπύρρηνο στάδιο που συσχετίζεται με συγκέντρωση αμύλου) και ότι βρίσκεται στη διαδικασία της διαίρεσης, δηλαδή είναι μεταβολικά αρκετά δραστήρια.

3.5.1.3. Θρεπτικό υπόστρωμα

Κάθε φυτικό είδος έχει συγκεκριμένες απαιτήσεις σε θρεπτικά στοιχεία, επομένως το θρεπτικό υπόστρωμα διαφέρει από είδος σε είδος.

Συνήθως κάθε θρεπτικό υπόστρωμα βάσης περιέχει μακροστοιχεία, μικροστοιχεία, βιταμίνες, ρυθμιστές αύξησης, οργανικά στοιχεία κ. ά., όμως η συγκέντρωση αυτών διαφέρει ανάλογα με το καλλιεργούμενο είδος ή ακόμη και την ποικιλία. Έτσι η σακχαρόζη, ενώ είναι απαραίτητη σε κάθε υπόστρωμα βάσης η συγκέντρωση διαφοροποιείται (2 – 3% στα περισσότερα φυτικά είδη, ενώ στα σιτηρά και στην πατάτα, φθάνει το 6 – 12%).

Οι ρυθμιστές αύξησης (αυξίνες και κυτοκινίνες) χρησιμοποιούνται συχνά στην καλλιέργεια ανθέρων και γύρης, και η επίδραση τους διαφοροποιείται ανάλογα με τον γονότυπο. Οι αυξίνες προάγουν το σχηματισμό κάλου στην ανθηροκαλλιέργεια σιτηρών, ενώ το ινδολοξικό οξύ

και η 6 – βενζυλαμινοπουρίνη (BAP) επηρεάζουν θετικά την πρόκληση εμβρυογένεσης στην πατάτα.

Μία άλλη χημική ουσία εξαιρετικής σημασίας στην καλλιέργεια ανθήρων είναι ο ενεργός άνθρακας, ο οποίος υποκινεί τη μονοπύρηνη γύρη σε διέγερση και παραγωγή εμβρυοειδών. Ο θετικός ρόλος του ενεργού άνθρακα φαίνεται να οφείλεται στην προσρόφηση διαφόρων παρεμποδιστικών ουσιών που υπάρχουν στο άγαρ ή προέρχονται από την αποδόμηση της σακχαρόζης κατά τη διάρκεια του κλιβανισμού.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑ

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΙΑΠΛΟΕΙΔΩΝ ΦΥΤΩΝ ΠΑΤΑΤΑΣ ΜΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΝΘΗΡΩΝ *IN VITRO*.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η πειραματική μου μελέτη, που αφορά : **την αξιολόγηση γαμετοκλωνικών φυτών πατάτας έναντι της φυλής Y^N του ιού Y της πατάτας (PVY)^N**, αξιοποιήθηκε γενετικό υλικό, το οποίο προέκυψε από προγενέστερο πείραμα, το οποίο αφορούσε την παραγωγή διαπλοειδών φυτών πατάτας με καλλιέργεια ανθέρων *in vitro*. Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γεωργίας και Παραγωγής Πολλαπλασιαστικού Υλικού του Τ.Ε.Ι. Κρήτης σε συνεργασία με τα Εργαστήρια Γενετικής Βελτίωσης : του τομέα Βιοτεχνολογίας του ΕΝΕΑ (Ρώμη, Ιταλία) και του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

1. Υλικά και μέθοδοι

1.1. Φυτικό υλικό έναρξης

Χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω τρεις γονότυποι πατάτας, οι οποίοι διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το επίπεδο πλοειδίας, το βαθμό ομοζυγωτίας, την ανθεκτικότητα έναντι παθογόνων και εχθρών και την αντίδραση στην ανθηροκαλλιέργεια :

- ❖ H2-258 τετραπλοειδής κλώνος, με υψηλή αντίδραση στην *in vitro* καλλιέργεια ανθέρων.
- ❖ F1-15 διπλοειδές υβρίδιο AH 78/8015.378 x 381320.23 με υψηλή ανδρογενετική ικανότητα, (ο πρώτος κλώνος έχει υψηλή ανδρογενετική ικανότητα, ενώ ο δεύτερος διαθέτει ανθεκτικότητα στους νηματώδεις *Meloidogyne spp.*).
- ❖ (2x-78c 11.5)₁₈ διπλοειδής κλώνος δεν διαθέτει ανδρογενετική ικανότητα, είναι άνοσος στον ιό Y της πατάτας (potato virus Y - PVY) και ανθεκτικός στον ιό X της πατάτας (potato virus X - PVX).

Οι παραπάνω γονότυποι χρησιμοποιήθηκαν ως φυτά “δωρητές” από τα οποία απομονώθηκαν οι ανθήρες και καλλιεργήθηκαν *in vitro*.

Αρχικά έγινε η συλλογή των “κλειστών ανθέων” όταν εμφάνισαν ένα ελαφρό πράσινο χρώμα και το μήκος τους κυμαινόταν από 3,5 μέχρι 5mm,

μορφολογικά γνωρίσματα που χαρακτηρίζουν για το μονοπύρηνο στάδιο ανάπτυξης της γύρης.

1.2. Προμεταχείριση και απολύμανση των “κλειστών ανθέων”

Τα ανώριμα “κλειστά άνθη” τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι μεταφέρθηκαν σε θερμοκρασία 6 °C για 72 h με στόχο να διατηρηθεί η ζωτικότητα της γύρης και να επιβραδυνθεί η κυτταροδιαίρεση. Στη συνέχεια απολυμάνθηκαν με αλκοόλη (70%) για 30 sec, και με υποχλωριώδες ασβέστιο (2,5%) για 10 min ακολούθησαν τρία διαδοχικά πλυσίματα με αποστειρωμένο νερό και εμφύτευση των ανθέρων σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα.

1.3. Θρεπτικό υπόστρωμα και εμφύτευση των ανθέρων

Μετά την απολύμανση πραγματοποιήθηκε η λήψη των ανθέρων και η καλλιέργεια τους σε τρυβλία Petri, που περιείχαν 10 ml θρεπτικού υποστρώματος. Ως υπόστρωμα καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε το P59 (Jacobsen & Sorogy 1978), το οποίο είχε αποστειρωθεί στους 120 °C για 20 min. Οι ανθήρες μεταφέρθηκαν σε κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης (θερμοκρασία 20 °C, ένταση φωτισμού 500 Lux και 16 h φωτοπερίοδο) και μετά από 6 – 8 εβδομάδες προσδιορίστηκε το ποσοστό των εμβρυογενών ανθέρων. Ακολούθησε η αφαίρεση των εμβρυοειδών και η καλλιέργεια τους σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μορφογένεση. Έμβρυα τα οποία “μορφοποιήθηκαν” σε βλαστίδια μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα ριζοβολίας για την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος και την εξέλιξη τους σε πλήρη φυτάρια.

1.4. Αποτελέσματα

Συνολικά αξιολογήθηκαν 7.942 ανθήρες και προσδιορίστηκε η εμβρυογενετική τους ικανότητα.

Ο τετραπλοειδής κλώνος H2-258 υστέρησε έναντι του διπλοειδούς ετεροζυγωτικού κλώνου F1-15 στην παραγωγή εμβρυοειδών και αναγεννημένων φυταρίων, όμως έδωσε μεγαλύτερο αριθμό βιώσιμων

φυταρίων, σε σχέση με το γονότυπο F1-15. Αντίθετα ο γονότυπος (2x-78 c11.5)₁₈ είτε δεν δημιούργησε ανθοταξίες, είτε δεν έδωσε εμβρυογενείς ανθήρες.

Από τον προσδιορισμό του επιπέδου πλοειδίας προέκυψε ότι ο γονότυπος – φυτό “δωρητής” H2-258 έδωσε 0% μονοαπλοειδείς γαμετοκλώνους, 62% διαπλοειδείς, 33% τετραπλοειδείς και 5% ανευπλοειδείς. Αντίθετα από τον γονότυπο – φυτό “δωρητή” F1-15 προέκυψαν 20% μονοαπλοειδείς γαμετόκλωνοι, 70% διαπλοειδείς 0% τετραπλοειδείς και 10% ανευπλοειδείς.

ΚΥΡΙΩΣ ΠΕΙΡΑΜΑ

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΓΑΜΕΤΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ ΠΑΤΑΤΑΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΦΥΛΗΣ Υ^N ΤΟΥ ΙΟΥ Υ ΤΗΣ ΠΑΤΑΤΑΣ (PVY)^N

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πατάτα (*Solanum tuberosum* L.) ως γνωστόν πολλαπλασιάζεται αγενώς, με αποτέλεσμα τα παθογόνα που την προσβάλλουν να μεταφέρονται στους κονδύλους και να διαιωνίζονται απρόσκοπτα. Σοβαρό πρόβλημα μολύνσεων αντιμετωπίζει από τους φυτικούς ιούς, οι σπουδαιότεροι από τους οποίους, όπως καταγράφηκαν από πρόσφατες μελέτες στον Ελληνικό χώρο είναι: ο ιός Υ (potato Y potyvirus, PVY), ο ιός Χ (potato X potyvirus, PVX), ο ιός S (potato S carlavirus, PVS), ο ιός Μ (potato M carlavirus, PVM), ο ιός Α (potato A potyvirus, PVA) και ο ιός του καρουλιάσματος των φύλλων (potato leafroll luteovirus, PLRV) (Αυγελής κ.ά., 1995). Επακόλουθο των ιολογικών προσβολών είναι η χαμηλή απόδοση, η περιορισμένη ανάπτυξη των φυτών, και τελικά ο εκφυλισμός τους, ο οποίος αναπόφευκτα οδηγεί στην απώλεια του κλώνου ή της ποικιλίας. Επομένως βασικός στόχος σε κάθε πρόγραμμα βελτίωσης θα πρέπει να είναι η ενσωμάτωση ανθεκτικότητας έναντι των ιών.

Η φυλή Υ^N του PVY προκαλεί ήπια συμπτωματολογία και συχνά λανθάνουσα μόλυνση στις Ευρωπαϊκές καλλιεργούμενες ποικιλίες, γεγονός που επέτρεψε τη συσσώρευση της στο Πολλαπλασιαστικό Υλικό. Η αντιμετώπιση του PVY στηρίζεται στην ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας (συναντώνται κυρίως σε άγρια είδη) έναντι του PVY ή στη δημιουργία παραλλακτικότητας συμπεριλαμβανομένης και της ανθεκτικότητας έναντι παθογόνων.

Η αντιμετώπιση του PVY στηρίζεται στη χρησιμοποίηση δύο κυρίαρχων γονιδίων υπερευαισθησίας. Το γονίδιο N_Y παρέχει τοπική υπερευπάθεια και βρέθηκε σε πολλές καλλιεργούμενες ποικιλίες και άγρια είδη (Ross, 1986), ενώ το γονίδιο R_Y απομονώθηκε από το *S. Stoloniferum* και εμφανίζει διάφορα επίπεδα ανθεκτικότητας που εξαρτώνται κυρίως από τη φυλή του PVY (Foxe, 1992).

Τα τελευταία χρόνια η αξιοποίηση των τεχνικών καλλιέργειας ιστών ή κυττάρων *in vitro* επέτρεψε τη δημιουργία παραλλακτικότητας, με δυνατότητα αξιοποίηση της σε προγράμματα βελτίωσης. Η καλλιέργεια ανθέρων *in vitro* αποτελεί πηγή γενετικής παραλλακτικότητας (σχετικής με ανθεκτικότητα έναντι των ιών) γνωστής ως γαμετοκλωνικής παραλλακτικότητας, (Grammatikaki et al., 2002). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η πρόκληση γαμετοκλωνικής παραλλακτικότητας επηρεάζεται κατά κύριο λόγο από τον γονότυπο, όμως και το κατάλληλο περιβάλλον μπορεί να βελτιώσει την αντίδραση των καλώς αντιδρούντων γονότυπων (Γραμματικάκη κ.ά., 1992, Γραμματικάκη και Καλτσίκης, 1994, Γραμματικάκη κ.ά., 1995a).

Από την αξιολόγηση (με τη δοκιμή DAS-ELISA) της συμπεριφοράς φυτών R1 (προέρχονται από κονδύλους ανδρογενετικών φυτών πατάτας) έναντι μηχανικών μολύνσεων της φυλής Y^N του ιού Y της πατάτας, προέκυψε υψηλό ποσοστό ανοσίας σε όλα τα επίπεδα πλοειδίας (1x, 2x και 4x). Το γεγονός αυτό πιθανώς να οφείλεται στο γονίδιο R_Y , ενώ η ανίχνευση της φυλής Y^N σε φυτά R1 χωρίς εμφανή συμπτώματα προσβολής οφείλεται στην απουσία του γονιδίου R_Y . (Γραμματικάκη κ.ά. 1995b, Grammatikaki et al., 1997).

Λαμβάνοντας υπόψη, τόσο τη σημασία της φυλής Y^N του ιού Y της πατάτας, όσο και τις δυνατότητες που παρέχει η ανθηροκαλλιέργεια για την δημιουργία ανθεκτικών φυτών πατάτας έναντι του PVY, θεωρήσαμε χρήσιμη την αξιολόγηση ανθεκτικών γαμετοκλωνικών φυτών πατάτας έναντι της φυλής Y^N του ιού Y της πατάτας, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η συγκεκριμένη ανθεκτικότητα διατηρείται στα ανδρογενετικά φυτά και επομένως θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν σε πειράματα γενετικής βελτίωσης.

1. *In vitro* πολλαπλασιασμός των γαμετοκλωνικών φυτών πατάτας

1.1. Υλικά και μέθοδοι

1.1.1. Φυτικό υλικό έναρξης

Για την πραγματοποίηση της παρούσας πειραματικής μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 20 γαμετόκλωνοι (Πίνακας 2), προερχόμενοι από τους γονότυπους φυτά “δωρητές” : H2-258 και F1-15 (βλέπε προκαταρκτικό πείραμα).

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι γαμετόκλωνοι : H2-258-1 Θ. Α., H2-258-8 Θ. Α., H2-258-13 Θ. Α., H2-258-23 Θ. Α., H2-258-33 Θ. Α., H2-258-40 Θ. Α., H2-258-43 Θ. Α., H2-258-45 Θ. Α., H2-258-54 Θ. Α., H2-258-2 Θ., H2-258-6 Θ., και H2-258-5 Υ., οι οποίοι προέκυψαν από καλλιέργεια ανθέρων του φυτού “δωρητή” H2-258. Αξίζει να σημειωθεί ότι από τους προαναφερθέντες γαμετοκλώνους οι 5 ήταν τετραπλοειδείς ($4x = 48$), ενώ οι υπόλοιποι 7 διαπλοειδείς ($2x = 24$).

Επιπρόσθετα στο πείραμα εντάχθηκαν οι γαμετόκλωνοι : F1-15-2 Θ. Α., F1-15-3 Θ. Α., F1-15-10 Θ. Α., F1-15-12 Θ. Α., F1-15-13 Θ. Α., F1-15-14 Θ. Α., F1-15-15 Θ. Α., F1-15-4 Θ., οι οποίοι προήλθαν από καλλιέργεια ανθέρων του φυτού “δωρητή” F1-15. Από τους παραπάνω 8 γαμετοκλώνους οι 5 ήταν διαπλοειδείς ($2x = 24$), οι δύο μονοαπλοειδείς ($2x = 12$), ενώ ένας ήταν ανευπλοειδής ($2x = 25$).

Το πείραμα συμπληρώθηκε χρησιμοποιώντας ως μάρτυρες (μη γαμετοκλωνικά φυτά) την ποικιλία *sebago* (ευαίσθητη στον ιό του καρουλιάσματος των φύλλων – PLRV), καθώς επίσης και το διπλοειδή κλώνο ($2x - 78c 11.5$)₁₈, ο οποίος είναι άνοσος στον ιό Υ της πατάτας (Potato Virus Y – PVY) και ανθεκτικός στον ιό Χ της πατάτας (Potato Virus X – PVX).

Πίνακας 2. Φυτικό υλικό (γαμετόκλωνοι) που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή του πειράματος.

Γαμετόκλωνοι	Αριθμός χρωμοσωμάτων
H2-258-1. Θ. Α.*	24
H2-258-8. Θ. Α.	24
H2-258-13. Θ. Α.	48
H2-258-23. Θ. Α.	24
H2-258-33. Θ. Α.	24
H2-258-40. Θ. Α.	48
H2-258-43. Θ. Α.	48
H2-258-45. Θ. Α.	48
H2-258-54. Θ. Α.	48
H2-258-2. Θ.**	24
H2-258-6. Θ.	24
H2-258-5. Υ.***	24
F1-15-2. Θ. Α.	12
F1-15-3. Θ. Α.	24
F1-15-10. Θ. Α.	12
F1-15-12. Θ. Α.	24
F1-15-13. Θ. Α.	24
F1-15-14. Θ. Α.	24
F1-15-15. Θ. Α.	25
F1-15-4. Θ.	24
(2x-78c 11.5) ₁₈	24
Sebago	48

* Θ. Α. = Η ανάπτυξη των φυτών “δωρητών” έγινε σε Θάλαμο Ανάπτυξης.

** Θ. = Η ανάπτυξη των φυτών “δωρητών” έγινε σε Θερμοκήπιο.

*** Υ. = Η ανάπτυξη των φυτών “δωρητών” έγινε στην Ύπαιθρο.

1.1.2. *In vitro* καλλιέργεια του φυτικού υλικού έναρξης

Το προαναφερθέν φυτικό υλικό διατηρείται στην Τράπεζα Γενετικού Υλικού (σε συνθήκες *in vitro*) του Εργαστηρίου Γεωργίας και Παραγωγής Πολλαπλασιαστικού Υλικού του Τ.Ε.Ι. Κρήτης και μου παραχωρήθηκε, προκειμένου να αξιολογηθεί έναντι της φυλής Υ^N του ιού Υ της πατάτας και να πραγματοποιήσω παράλληλα την πτυχιακή μου εργασία.

Για να εξασφαλισθεί ένας ικανοποιητικός αριθμός φυτών απαραίτητος για την διεξαγωγή του πειράματος το φυτικό υλικό έναρξης εντάχθηκε σε *in*

in vitro διαδοχικούς μικροπολλαπλασιασμούς. Αρχικά μεταφέρεται σε θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής (ασηπτικές συνθήκες) και με τη βοήθεια αποστειρωμένων εργαστηριακών εργαλείων (λαβίδες, νυστέρια, ψαλίδια κ. α.), ακολουθεί ο μικροπολλαπλασιασμός (Εικόνα 1). Από κάθε φυτάριο δημιουργούνται “μικρομοσχεύματα” μήκους περίπου 1 cm, τα οποία περιελάμβαναν 1 – 2 κόμβους με το αντίστοιχο τμήμα του μεσογονατίου. Στη συνέχεια κάθε “μικρομόσχευμα” με τη βοήθεια αποστειρωμένης εργαστηριακής λαβίδας εμφυτεύεται σε δοκιμαστικό σωλήνα, ο οποίος περιείχε περίπου 10 ml θρεπτικού υποστρώματος των Murashige & Skoog 1962 (Πίνακας 4). Οι δοκιμαστικοί σωλήνες (με τα υπό καλλιέργεια έκφυτα) κλείνονται προσεκτικά και μεταφέρονται σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών ανάπτυξης (θερμοκρασία $25 \pm 0,5$ °C, 16 ώρες φωτοπερίοδο και ένταση φωτισμού 3500 Lux), όπου παρέμειναν για 45 περίπου ημέρες (Εικόνα 2).

Η εγκατάσταση του πειράματος (καλλιέργεια των “μικρομοσχευμάτων”) έγινε σε 2 ημέρες κατά τη διάρκεια των οποίων εμφυτεύτηκαν περίπου 330 έκφυτα, δηλαδή έγινε 1 επέμβαση, χρησιμοποιήθηκαν 22 γονότυποι με 15 επαναλήψεις (Πίνακας 3).



Εικόνα 1. Μικροπολλαπλασιασμός φυταρίων πατάτας σε θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής (ασηπτικές συνθήκες).



Εικόνα 2. Ανάπτυξη των υπό καλλιέργεια έκφυτων σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών.

Πίνακας 3. Χρονοδιάγραμμα καλλιέργειας των “μικρομοσχευμάτων” (εγκατάσταση πειράματος) στο θρεπτικό υπόστρωμα.

Γονότυπος	Ημ/νία εγκατάστασης	Αριθμός εκφύτων	Αριθμός φυταρίων
H2-258-1. Θ. Α.	20/8/02	15	4
H2-258-8. Θ. Α.	20/8/02	15	6
H2-258-13. Θ. Α.	20/8/02	15	6
H2-258-23. Θ. Α.	20/8/02	15	6
H2-258-33. Θ. Α.	20/8/02	15	9
H2-258-40. Θ. Α.	20/8/02	15	6
H2-258-43. Θ. Α.	20/8/02	15	5
H2-258-45. Θ. Α.	20/8/02	15	6
H2-258-54. Θ. Α.	20/8/02	15	14
H2-258-2. Θ.	20/8/02	15	7
H2-258-6. Θ.	20/8/02	15	6
H2-258-5. Υ.	20/8/02	15	6
F1-15-2. Θ. Α.	21/8/02	15	15
F1-15-3. Θ. Α.	21/8/02	15	14
F1-15-10. Θ. Α.	21/8/02	15	11
F1-15-12. Θ. Α.	21/8/02	15	10
F1-15-13. Θ. Α.	21/8/02	15	13
F1-15-14. Θ. Α.	21/8/02	15	8
F1-15-15. Θ. Α.	21/8/02	15	6
F1-15-4. Θ.	21/8/02	15	5
(2x-78c 11.5) ₁₈	21/8/02	15	5
Sebago	21/8/02	15	12

1.1.3. Προετοιμασία του θρεπτικού υποστρώματος

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα υπόστρωμα βάσης, το οποίο περιείχε τα μακροστοιχεία, μικροστοιχεία και βιταμίνες των Murashige & Skoog 1962 (Πίνακας 4). Τα χημικά αυτά υλικά πάρθηκαν από μητρικές διαλύσεις (100 ml μακροστοιχεία, 100 ml μικροστοιχεία, 10 ml βιταμίνες), οι οποίες παρασκευάζονται και διατηρούνται στο Εργαστήριο Γεωργίας και Παραγωγής Πολλαπλασιαστικού Υλικού. Οι προαναφερόμενες ποσότητες τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη και προστέθηκε απιονισμένο νερό (1000 ml),

ινοζιτόλη (100 mg/l), sequestren (50 mg/l), σακχαρόζη (30 gr/l) και άγαρ (8 gr/l).

Στη συνέχεια η φιάλη μεταφέρεται σε θερμαινόμενο αναδευτήρα, προκειμένου να γίνει ανάδευση των υλικών και να σχηματιστεί ένα ομοιογενές διάλυμα. Ακολουθεί ο προσδιορισμός του pH, το οποίο ρυθμίζεται στο 5,8 χρησιμοποιώντας ανάλογα NaOH (0,1N) ή HCl (0,1N).

Μετά το τέλος της ανάδευσης, το θρεπτικό διάλυμα διανέμεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι κλείνονται με φελλούς και στη συνέχεια μεταφέρονται σε υγρό κλίβανο αποστείρωσης, όπου το θρεπτικό υπόστρωμα αποστειρώνεται στους 120 °C για 20 λεπτά της ώρας.

Πίνακας 4. Υπόστρωμα καλλιέργειας προτεινόμενο από τους Murashige & Skoog 1962.

Macro nutrients	
KNO ₃	1900mg/L
KH ₂ PO ₄	170mg/L
NH ₄ NO ₃	1650mg/L
Mg SO ₄ 7H ₂ O	370mg/L
CaCl ₂ 2 H ₂ O	440mg/L
Micro nutrients	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8mg/L
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3mg/L
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8,6mg/L
H ₃ BO ₃	6,2mg/L
K I	0,83mg/L
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,025mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025mg/L
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25mg/L
Na ₂ EDTA	37,23mg/L
Vitamins	
Nicotinic acid	0,5mg/L
Pyridoxidine HCl	0,5mg/L
Thiamine HCl	0,1mg/L
Glycine	2mg/L

1.1.4. Μεταφορά των φυταρίων από τις *in vitro* σε *in vivo* συνθήκες (εγκλιματισμός)

Τα υπό καλλιέργεια έκφυτα και των 22 γονότυπων (πίνακας 3) αφού παρέμειναν για 1,5 περίπου μήνα στις *in vitro* συνθήκες, εξελίχθηκαν σε πλήρη φυτάρια, με ένα πολύ καλά ανεπτυγμένο υπέργειο και υπόγειο τμήμα (Εικόνα 3). Αμέσως μετά οι δοκιμαστικοί σωλήνες μεταφέρονται από το θάλαμο ανάπτυξης στο Εργαστήριο, όπου με τη βοήθεια εργαστηριακής λαβίδας γίνεται η εξαγωγή των φυταρίων από τους δοκιμαστικούς σωλήνες. Ακολουθεί ξέπλυμα του ριζικού συστήματος με άφθονο νερό βρύσης (με χαμηλή ταχύτητα ροής) για την πλήρη απομάκρυνση του θρεπτικού υποστρώματος (Εικόνα 4). Στη συνέχεια τα φυτάρια μεταφυτεύονται σε πλαστικά ποτηράκια (με διάτρητο πυθμένα) των 150 ml, τα οποία περιείχαν μίγμα τύρφης και περλίτη (1 : 2) και ακολουθεί πότισμα με νερό βρύσης (Εικόνα 5).

Τα ποτηράκια με τα φυτάρια τοποθετούνται σε διαφανείς πλαστικούς κλωβούς, προκειμένου η υγρασία του νέου περιβάλλοντος (*in vivo*) να προσεγγίζει τιμές παρόμοιες με τις *in vitro* συνθήκες. Στη συνέχεια μεταφέρονται εκ νέου σε θάλαμο ανάπτυξης (θερμοκρασία $25 \pm 0,5$ °C, 16 ώρες φωτοπερίοδο και ένταση φωτισμού 3500 Lux), όπου για τις πρώτες περίπου 20 ημέρες τα φυτά δεν ποτίζονται και οι κλωβοί παραμένουν τελείως κλειστοί με διαφανές κάλυμμα (Εικόνα 6). Μετά από 20 ημέρες απομακρύνεται σταδιακά το κάλυμμα του κλωβού με σκοπό τη σταδιακή επαφή των φυτών με το εξωτερικό περιβάλλον. Μετά από αυτή τη διαδικασία, ακολουθεί μια παραπέρα μεταφύτευση των φυταρίων σε μεγαλύτερα γλαστράκια (500 ml), προκειμένου να αναπτύξουν περισσότερους βλαστούς και ένα καλύτερα αναπτυγμένο ριζικό σύστημα. Στη συνέχεια τα φυτάρια μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Φυτικής Ιολογίας του Ινστιτούτου Προστασίας Φυτών Ηρακλείου του Ε.Θ.Ι.Α.Γ.Ε., προκειμένου να προσδιοριστεί το επίπεδο φυτοϋγείας τους έναντι της νεκρωτικής φυλής Υ^N του ιού Υ της πατάτας (PVY^N).



Εικόνα 3. Μικροπολλαπλασιασθέντα φυτάρια πατάτας σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης.



Εικόνα 4. Ξέπλυμα ριζικού συστήματος φυτού πατάτας για την απομάκρυνση του θρεπτικού υποστρώματος.



Εικόνα 5. Μεταφορά φυταρίων πατάτας σε *in vivo* συνθήκες.



Εικόνα 6. Εγκλιματισμός φυταρίων πατάτας σε διαφανείς πλαστικούς κλωβούς.

2. Προσδιορισμός του επιπέδου φυτοϋγείας των γαμετοκλωνικών φυτών έναντι της νεκρωτικής φυλής Y^N του ιού Y της πατάτας (PVY)^N

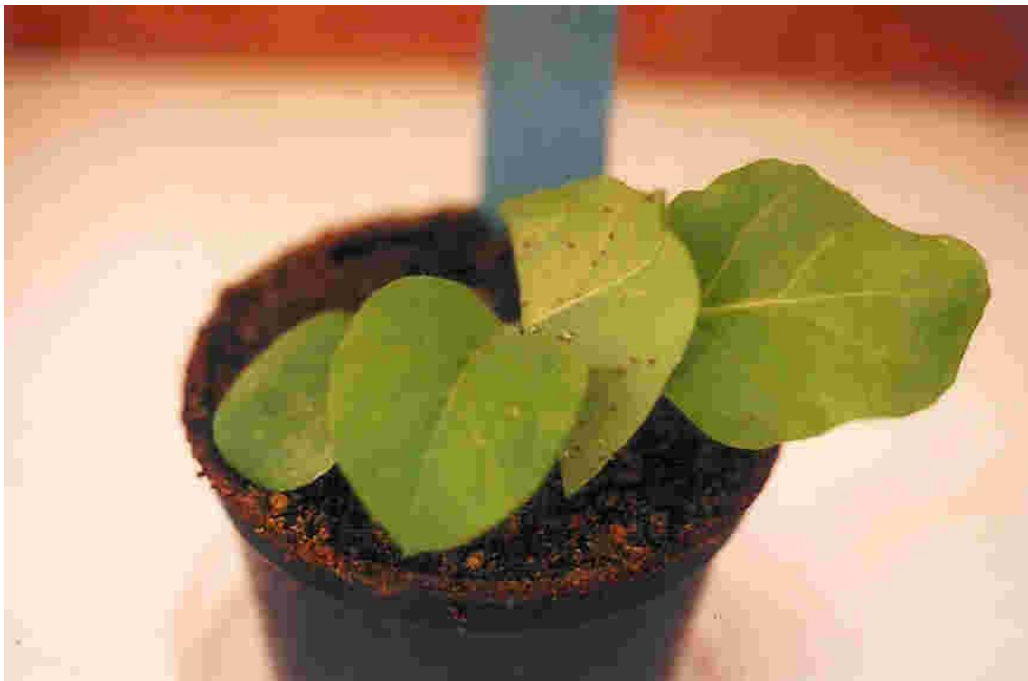
2.1. Arena test

Προκειμένου να αξιολογηθεί το επίπεδο φυτοϋγείας των γαμετοκλωνικών φυτών (πίνακας 2) έναντι της φυλής Y^N του ιού Y της πατάτας χρησιμοποιήθηκαν φυτά καπνού, τα οποία μολύνθηκαν μηχανικά με την προαναφερόμενη φυλή του PVY. Τα φυτά καπνού παρέμειναν για μερικές ημέρες σε θερμοκήπιο με ημιελεγχόμενες συνθήκες ανάπτυξης, προκειμένου να γίνει ο πολλαπλασιασμός των ιοσωματίων και να μολυνθεί ολόκληρο το φυτό. Στη συνέχεια τα μολυσμένα φυτάρια καπνού μεταφέρθηκαν σε κλωβούς (Εικόνα 7) και πάνω στα φύλλα τους τοποθετήθηκαν αφίδες του είδους *Myzus persicae* με σκοπό τη μόλυνση τους από τα μολυσμένα φυτάρια καπνού (Εικόνα 8). Οι κλωβοί ήταν κατασκευασμένοι από ξύλο και εντομοστεγές δίκτυ, με αποτέλεσμα να εξασφαλίζεται καλός φωτισμός και αερισμός (απαραίτητα στοιχεία για την ανάπτυξη των φυτών) και παράλληλα να εμποδίζεται η έξοδος των αφίδων.

Σε κάθε κλωβό τοποθετήθηκε ένα μολυσμένο φυτό καπνού αποικισμένο μ' ένα σημαντικό αριθμό αφίδων. Περιμετρικά από το φυτό αυτό τοποθετούνται περίπου 10 γαμετοκλωνικά φυτά πατάτας κατά προτίμηση από τον ίδιο γονότυπο (Εικόνα 9). Σε τακτά χρονικά διαστήματα ακολουθούσε μακροσκοπικός έλεγχος, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν και πόσα γαμετοκλωνικά φυτά πατάτας είχαν αποικιστεί από τις αφίδες. Σε όλες τις περιπτώσεις αποικισμού ακολουθούσε απομάκρυνση των αποικισμένων φυτών πατάτας από τους κλωβούς, προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο βιολογικός έλεγχος (μετάδοση σε φυτά καπνού).



Εικόνα 7. Τοποθέτηση των φυτάρων καπνού σε “εντομοστεγείς” κλωβούς.



Εικόνα 8. Αφίδες του είδους *Myzus persicae* σε νεαρό φυτάριο καπνού, τοποθετημένο σε “εντομοστεγή” κλωβό.



Εικόνα 9. Γαμετοκλωνικά φυτά πατάτας και καπνού αποικισμένα με αφίδες σε “εντομοστεγείς” κλωβούς.

2.2. Βιολογικός έλεγχος

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε βιολογικός έλεγχος προκειμένου να αποδειχθεί εάν τα αποικισμένα με αφίδες φυτά πατάτας είχαν μολυνθεί με τη φυλή Y^N του ιού Y της πατάτας. Από κάθε φυτό πατάτας ελαμβάνετο τμήμα της βλαστικής κορυφής για να ακολουθήσει βιολογικός έλεγχος με χρησιμοποίηση φυτοδεικτών του γένους *Nicotiana*. Οι βλαστικές κορυφές ετοποθετούντο σε αποστειρωμένα γουδιά πορσελάνης, προσθέτοντας φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (0,5 ml), γη διατόμων και ακολουθούσε πολτοποίηση του δείγματος. Με τη βοήθεια βαμβακοφόρου λαμβάνονταν ποσότητα από το πολτοποιημένο δείγμα και απλωνόταν πάνω στα φύλλα καπνού, στα οποία δημιουργούνται μικροτραύματα (γη διατόμων) με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η είσοδος του ιού στους φυτικούς ιστούς. Ακολουθεί ξέπλυμα των μολυσμένων φυτών καπνού και σε κάθε γλαστράκι τοποθετείται ετικέτα, όπου αναγράφεται ο γαμετόκλωνος (φυτό πατάτας) από τον οποίο προήλθε το πολτοποιημένο δείγμα, καθώς επίσης και η ημερομηνία

μόλυνσης. Ο βιολογικός έλεγχος κάθε γαμετοκλωνικού φυτού πατάτας έγινε σε δύο διαφορετικούς φυτοδείκτες του γένους *Nicotiana*.

Αμέσως μετά τα φυτά του καπνού τοποθετήθηκαν κατά ομάδες σε δίσκους και μεταφέρθηκαν σε θάλαμο με ελεγχόμενες συνθήκες ανάπτυξης, όπου σε τακτά χρονικά διαστήματα ακολουθούσε μακροσκοπικός έλεγχος για ενδεχόμενη εμφάνιση πρωτογενών συμπτωμάτων μόλυνσης από τη φυλή Y^N του ιού Y της πατάτας.

2.3. Δοκιμή ELISA

Εκτός από το βιολογικό έλεγχο κρίθηκε χρήσιμο να αξιοποιηθεί και η ορολογική δοκιμή DAS – ELISA (έχει μεγαλύτερη ευαισθησία έναντι του βιολογικού ελέγχου και άλλων ορολογικών δοκιμών), προκειμένου τα φυτάρια της πατάτας να υποστούν μια παραπέρα αξιολόγηση έναντι της φυλής Y^N του ιού Y της πατάτας. Για το σκοπό αυτό πάρθηκαν δείγματα από τις βλαστικές κορυφές των φυτών πατάτας και καπνού. Ακολούθησε η αρίθμηση των δειγμάτων, το ζύγισμα σε ζυγό ακριβείας και η τοποθέτηση τους σε αποστειρωμένο γουδί πορσελάνης. Στη συνέχεια προστέθηκε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα εξαγωγής (Extraction buffer) στη δόση των 10 ml/gr φυτικού ιστού, καθώς επίσης και μερικοί κόκκοι άμμου και ακολούθησε ομογενοποίηση του δείγματος.

Ο χυμός που εξήχθη από κάθε φυτικό δείγμα τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα, ο οποίος αφού κλείστηκε μεταφέρθηκε σε θερμοκρασία 4⁰C – 6⁰C μέχρι και 3 ώρες. Χρησιμοποιήθηκαν πλάκες LIMBRO – ELISA και ένα εμπορικό διαγνωστικό σκεύασμα ενός πολυκλωνικού αντιορού του PVY.

Ακολούθησε η δοκιμή DAS – ELISA, η οποία περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 5):

1. Στις υποδοχές (κυψελίδες) κάθε πλάκας τοποθετήθηκε η γ-ανοσοσφαιρίνη (100μl/υποδοχή) του ιού αραιωμένη στο Coating buffer και ακολούθησε επώαση για 2,5 ώρες στους 37⁰C (η γ – ανοσοσφαιρίνη προσκολλάται στα τοιχώματα της υποδοχής – κυψελίδας).
2. Στη συνέχεια η πλάκα πλύθηκε διαδοχικά τέσσερις φορές για 3΄ με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (Wash buffer) για να απομακρυνθούν οι γ

- ανοσοσφαιρίνες που δεν κόλλησαν στα τοιχώματα. Σε κάθε υποδοχή – κυψελίδα τοποθετείται το δείγμα (100 μl χυμού αραιωμένο με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα εξαγωγής) και ακολουθεί επώαση στους 4 – 6°C για 24 ώρες (εάν στο δείγμα υπάρχουν ιοσωμάτια τότε ο ιός αναγνωρίζεται και συνδέεται με τις ομόζυγες γ – ανοσοσφαιρίνες)
3. Ακολούθησε πλύσιμο της πλάκας με απεσταγμένο νερό και στη συνέχεια τέσσερα διαδοχικά πλυσίματα με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (Wash buffer). Στη συνέχεια σε κάθε υποδοχή τοποθετούνται 100μl από γ – ανοσοσφαιρίνη συζευγμένη με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (Conjugate buffer) και ακολουθεί επώαση για 3 – 4 ώρες στους 37°C, (σύμπλοκο γ – ανοσοσφαιρίνη + αλκαλική φωσφατάση με το υπάρχον σύμπλοκο ιός + γ – ανοσοσφαιρίνη).
 4. Επαναλήφθηκαν τέσσερα διαδοχικά πλυσίματα με το φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS – T) και τελικά προστέθηκαν σε κάθε υποδοχή 100μl ενζυμικού υποστρώματος (Substrate buffer) και οι πλάκες (σκεπασμένες με χαρτί για να μην έρχονται σε επαφή με το φως) παραμένουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 – 3 ώρες. Αρχικά γίνεται ένας μακροσκοπικός έλεγχος κάθε πλάκας προκειμένου να προσδιοριστεί η συμπεριφορά των δειγμάτων έναντι της φυλής Y^N από το κίτρινο χρώμα που ενδεχόμενα θα εμφανισθεί στις υποδοχές – κυψελίδες (Εικόνα 10). (Το ενζυμικό υπόστρωμα υδρολύεται και το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση μόνο στις υποδοχές όπου αυτό υπάρχει σαν σύμπλοκο γ – ανοσοσφαιρίνη + ιός + γ – ανοσοσφαιρίνη – αλκαλική φωσφατάση δίνοντας ένα κίτρινο χρώμα με διαφορετική ένταση ανάλογα με την ποσοτική παρουσία του ιού).

Στη συνέχεια οι πλάκες μετρήθηκαν στα 405 nm με ένα φασματοφωτόμετρο MIOS JUNIOR και οι τιμές απορρόφησης καταγράφηκαν μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή. Κάθε πλάκα περιείχε δείγμα από υγιή φυτά (αρνητικός μάρτυρας) και δείγμα από μολυσμένα (θετικός μάρτυρας).

Πίνακας 5. Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την δοκιμή ELISA.

Extraction buffer	
PVP	20gr/L
OA (Albumin Bovine)	2gr/L
Na ₂ SO ₃	1,3gr/L
NaN ₃	0,2gr/L
Tween	5m/L
NaCl	8gr/L
KH ₂ PO ₄	0,2gr/L
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	1,15gr/L
KCl	0,2gr/L
PH = 7,4	
Coating buffer	
Na ₂ CO ₃	1,588gr/L
NaHCO ₃	2,940gr/L
NaN ₃	0,2gr/L
PH : 9,6 με HCl →1000ml H ₂ O απεσταγμένο	
PBS (x10)	
NaCl	80gr/L
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	14,4gr/L
KH ₂ PO ₄	2gr/L
KCl	2gr/L
NaN ₃	1gr/L
PH : 7,4 (αύξηση του pH με NaOH)	
Tween 10%	
Tween 20 (πυκνό)	10ml
H ₂ O (απεσταγμένο)	90ml
Wash buffer	
PBS (x10)	100ml
H ₂ O (απεσταγμένο)	900ml
Tween 10%	5ml
Conjugate buffer	
Wash buffer	100ml
PVP 24.000	2gr
BSA	0,2gr
Substrate buffer or Diethanolamine	
Diethanolamine	19,4ml/200ml
NaN ₃	0,02gr/200ml
Cl ₂ Mg.6H ₂ O	0,02gr/200ml
pH : 9,8 με HCl →200ml H ₂ O (απεσταγμένο)*	

*Στο οποίο διαλύουμε την στερεή ουσία P-nitrophenyl phosphate Substrate buffer in diethanolamine buffer (1mg/ml).



Εικόνα 10. Τελική φάση δοκιμής DAS – ELISA έναντι πολυκλωνικού αντιορού PVY.

3. Αποτελέσματα

Από τους 22 συνολικά γαμετόκλωνους που εντάχθηκαν στην παρούσα πειραματική μελέτη, αξιολογήθηκαν με τη δοκιμή DAS – ELISA έναντι στην φυλή Y^N του PVY: 8 από το γονότυπο H2-258 (H2-258-23 Θ. Α., H2-258-33 Θ. Α., H2-258-40 Θ. Α., H2-258-43 Θ. Α., H2-258-45 Θ. Α., H2-258-54 Θ. Α., H2-258-2 Θ., H2-258-6 Θ), 8 από το γονότυπο F1-15 (F1-15-2 Θ. Α., F1-15-3 Θ. Α., F1-15-10 Θ. Α., F1-15-12 Θ. Α., F1-15-13 Θ. Α., F1-15-14 Θ. Α., F1-15-15 Θ. Α., F1-15-4 Θ.) και οι δύο μάρτυρες: ο διπλοειδής κλώνος (2x – 78c 11.5)₁₈ και η ποικιλία sebage. Τέσσερις γαμετόκλωνοι (H2-258-1 Θ. Α., H2-258-8 Θ. Α., H2-258-13 Θ. Α. και H2-258-5 Υ) δεν κατέστη δυνατόν να αξιολογηθούν, καθόσον τα μικροπολλαπλασιασθέντα φυτάρια υπέστησαν ζημιές κατά τη διαδικασία του εγκλιματισμού (Πίνακας 6).

Πίνακας 6. Αριθμός φυτών πατάτας και καπνού που αξιολογήθηκαν κατά την δοκιμή DAS – ELISA.

Γονότυπος	Αριθμός φυτών κατά την δοκιμή DAS –ELISA	
	Πατάτα	Καπνός
H2-258-1. Θ. Α.	0	0
H2-258-8. Θ. Α.	0	0
H2-258-13. Θ. Α.	0	0
H2-258-23. Θ. Α.	4	2
H2-258-33. Θ. Α.	0	2
H2-258-40. Θ. Α.	0	2
H2-258-43. Θ. Α.	4	1
H2-258-45. Θ. Α.	1	2
H2-258-54. Θ. Α.	13	6
H2-258-2. Θ.	0	2
H2-258-6. Θ.	0	2
H2-258-5. Υ.	0	0
F1-15-2. Θ. Α.	15	8
F1-15-3. Θ. Α.	14	9
F1-15-10. Θ. Α.	7	6
F1-15-12. Θ. Α.	9	3
F1-15-13. Θ. Α.	3	4
F1-15-14. Θ. Α.	4	2
F1-15-15. Θ. Α.	3	3
F1-15-4. Θ.	1	3
(2x-78c 11.5) ₁₈	2	2
Sebago	12	6
Σύνολο	92	65

Ο ιολογικός μακροσκοπικός έλεγχος που έγινε στο σύνολο των μικροπολλαπλασιασθέντων γαμετοκλωνικών φυταρίων σε συνθήκες *in vivo* έδωσε αρνητικά αποτελέσματα για την παρουσία πρωτογενών συμπτωμάτων της φυλής Υ^N του PVY.

Για το λόγο αυτό κρίθηκε χρήσιμο τα φυτάρια αυτά να υποστούν μια παραπέρα αξιολόγηση (έναντι της φυλής Υ^N του PVY), αξιοποιώντας τη δοκιμή DAS – ELISA. Η αξιολόγηση των γαμετοκλώνων έναντι της φυλής Υ^N του PVY έγινε σε τρεις επαναλήψεις. Συνολικά ελέγχθηκαν 92 γαμετοκλωνικά φυτά πατάτας και 65 καπνού. Συγκεκριμένα στην Α επανάληψη ελέγχθηκαν 50 δείγματα, από τα οποία τα 26 ήταν φυτά πατάτας (είχαν μολυνθεί με τον PVY, μετάδοση με αφίδες) και τα 24 καπνού (μολύνθηκαν μηχανικά από μόλυσμα προερχόμενο από φυτά πατάτας) (Πίνακας 7). Στη Β επανάληψη ελέγχθηκαν 55 δείγματα, από τα οποία τα 23 ήταν φυτά πατάτας (είχαν μολυνθεί με τον PVY μετάδοση με αφίδες) και 32 καπνού (μολύνθηκαν μηχανικά με μόλυσμα προερχόμενο από φυτά πατάτα) (Πίνακας 8). Στη Γ επανάληψη ελέγχθηκαν 52 δείγματα, από τα οποία τα 43 ήταν φυτά πατάτας και 9 καπνού (Πίνακας 9).

Ο έλεγχος των φυτών αυτών με τη δοκιμή ELISA επίσης υπήρξε αρνητικός, καθόσον σε όλα τα δείγματα οι τιμές απορρόφησης (OD= Optical Density) στα 405 nm ήταν παρόμοιες ή λίγο μεγαλύτερες από τις τιμές απορρόφησης των αρνητικών – υγιών μαρτύρων. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι τιμές απορρόφησης των δειγμάτων ήταν πολύ μικρότερες από τις τιμές απορρόφησης των θετικών – μολυσμένων μαρτύρων (Εικόνα 12, 14 και 16).

Επανάληψη A

Εικόνα 11. Σχηματική παράσταση της πλάκας ELISA, όπου EB = Ρυθμιστικό εξαγωγής (extraction buffer), H 1 = Υγιής μάρτυρας 1, H 2 = Υγιής μάρτυρας 2, INF1 = Μολυσμένος μάρτυρας 1, INF2 = Μολυσμένος μάρτυρας 2 και 1 – 50 δείγματα υπό έλεγχο.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
2	H ₂ O	EB	8	18	28	36	46	H ₂ O
3	H ₂ O	H 1	9	19	29	37	47	H ₂ O
4	H ₂ O	INF1	10	20	30	38	48	H ₂ O
5	H ₂ O	1	11	21	31	39	49	H ₂ O
6	H ₂ O	2	12	22	32	40	50	H ₂ O
7	H ₂ O	3	13	23	33	41	H ₂ O	H ₂ O
8	H ₂ O	4	14	24	34	42	H ₂ O	H ₂ O
9	H ₂ O	5	15	25	35	43	H ₂ O	H ₂ O
10	H ₂ O	6	16	26	H 2	44	H ₂ O	H ₂ O
11	H ₂ O	7	17	27	INF2	45	H ₂ O	H ₂ O
12	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O

Εικόνα 12. Ακριβής καταγραφή των τιμών απορρόφησης (OD₄₀₅) της πλάκας.

Mios junior :E 02 / 26 / 03 11 : 44 : 34

READ MODE : A to H

ABSORBANCE MODE 8 PAGE 1 02 / 26 / 03 11 : 46 : 15

LOT NUMBER : _____ EXP. DATE : _____ ANALYST : _____

WAVELENGTHS = 405 NM

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	0 . 235	0 . 237	0 . 262	0 . 238	0 . 221	0 . 208	0 . 238	0 . 227
2	0 . 212	0 . 967	0 . 717	0 . 620	0 . 710	0 . 668	0 . 638	0 . 239
3	0 . 238	0 . 786	0 . 619	0 . 716	0 . 614	0 . 649	0 . 648	0 . 271
4	0 . 229	3 . 168	0 . 644	0 . 653	0 . 713	0 . 519	0 . 786	0 . 303
5	0 . 248	0 . 664	0 . 657	0 . 591	0 . 712	0 . 624	0 . 614	0 . 279
6	0 . 287	0 . 845	0 . 642	0 . 611	0 . 656	0 . 607	0 . 634	0 . 297
7	0 . 245	0 . 955	0 . 706	0 . 688	0 . 609	0 . 665	1 . 435	0 . 288
8	0 . 271	0 . 669	0 . 644	0 . 557	0 . 574	0 . 675	1 . 374	0 . 307
9	0 . 265	0 . 762	0 . 644	0 . 766	0 . 657	0 . 724	0 . 326	0 . 291
10	0 . 281	0 . 716	0 . 807	0 . 784	0 . 853	0 . 632	0 . 285	0 . 307
11	0 . 260	0 . 673	0 . 813	0 . 763	2 . 899	1 . 701	0 . 332	0 . 299
12	0 . 284	0 . 273	0 . 278	0 . 247	0 . 250	0 . 258	0 . 244	0 . 235

Πίνακας 7. Φυτά πατάτας και καπνού, τα οποία ελέγχθηκαν (Επανάληψη Α) με τη δοκιμή ELISA. Η αρίθμηση των δειγμάτων (1 – 55) αντιστοιχεί στις αριθμημένες υποδοχές – κυψελίδες της πλάκας ELISA (Εικόνα 11 και 12).

Αριθμός δειγμάτων	Γαμετόκλωνος	Φυτό	Αριθμός δειγμάτων	Γαμετόκλωνος	Φυτό
No 1	H2-258-23 Θ.Α.	Πατάτα	No 28	F1-15-3 Θ.Α.	Καπνός
No 2	H2-258-23 Θ.Α.	Πατάτα	No 29	F1-15-10 Θ.Α.	Πατάτα
No 3	H2-258-23 Θ.Α.	Πατάτα	No 30	F1-15-10 Θ.Α.	Πατάτα
No 4	H2-258-23 Θ.Α.	Καπνός	No 31	F1-15-10 Θ.Α.	Καπνός
No 5	H2-258-33 Θ.Α.	Καπνός	No 32	F1-15-12 Θ.Α.	Πατάτα
No 6	H2-258-33 Θ.Α.	Καπνός	No 33	F1-15-12 Θ.Α.	Πατάτα
No 7	H2-258-40 Θ.Α.	Καπνός	No 34	F1-15-12 Θ.Α.	Καπνός
No 8	H2-258-43 Θ.Α.	Πατάτα	No 35	F1-15-13 Θ.Α.	Πατάτα
No 9	H2-258-43 Θ.Α.	Καπνός	No 36	F1-15-13 Θ.Α.	Καπνός
No 10	H2-258-43 Θ.Α.	Πατάτα	No 37	F1-15-13 Θ.Α.	Καπνός
No 11	H2-258-45 Θ.Α.	Πατάτα	No 38	F1-15-14 Θ.Α.	Πατάτα
No 12	H2-258-45 Θ.Α.	Καπνός	No 39	F1-15-14 Θ.Α.	Καπνός
No 13	H2-258-54 Θ.Α.	Πατάτα	No 40	F1-15-15 Θ.Α.	Πατάτα
No 14	H2-258-54 Θ.Α.	Πατάτα	No 41	F1-15-15 Θ.Α.	Καπνός
No 15	H2-258-54 Θ.Α.	Πατάτα	No 42	F1-15-4 Θ.	Πατάτα
No 16	H2-258-54 Θ.Α.	Πατάτα	No 43	F1-15-4 Θ.	Καπνός
No 17	H2-258-54 Θ.Α.	Καπνός	No 44	(2x-78c 11.5) ₁₈	Πατάτα
No 18	H2-258-2 Θ.	Καπνός	No 45	(2x-78c 11.5) ₁₈	Καπνός
No 19	H2-258-2 Θ.	Καπνός	No 46	(2x-78c 11.5) ₁₈	Καπνός
No 20	H2-258-6 Θ.	Καπνός	No 47	Sebago	Πατάτα
No 21	H2-258-6 Θ.	Καπνός	No 48	Sebago	Πατάτα
No 22	F1-15-2 Θ.Α.	Πατάτα	No 49	Sebago	Καπνός
No 23	F1-15-2 Θ.Α.	Πατάτα	No 50	Sebago	Καπνός
No 24	F1-15-2 Θ.Α.	Καπνός	No 51	H ₂ O	
No 25	F1-15-3 Θ.Α.	Πατάτα	No 52	H ₂ O	
No 26	F1-15-3 Θ.Α.	Πατάτα	No 53	H ₂ O	
No 27	F1-15-3 Θ.Α.	Πατάτα	No 54	H ₂ O	
			No 55	H ₂ O	

Επανάληψη Β

Εικόνα 13. Σχηματική παράσταση της πλάκας ELISA, όπου EB = Ρυθμιστικό εξαγωγής (extraction buffer), H 1 = Υγιής μάρτυρας 1, H 2 = Υγιής μάρτυρας 2, INF1 = Μολυσμένος μάρτυρας 1, INF2 = Μολυσμένος μάρτυρας 2 και 1 – 55 δείγματα υπό έλεγχο.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
2	H ₂ O	EB	8	18	28	36	46	H ₂ O
3	H ₂ O	H 1	9	19	29	37	47	H ₂ O
4	H ₂ O	INF1	10	20	30	38	48	H ₂ O
5	H ₂ O	1	11	21	31	39	49	H ₂ O
6	H ₂ O	2	12	22	32	40	50	H ₂ O
7	H ₂ O	3	13	23	33	41	51	H ₂ O
8	H ₂ O	4	14	24	34	42	52	H ₂ O
9	H ₂ O	5	15	25	35	43	53	H ₂ O
10	H ₂ O	6	16	26	H 2	44	54	H ₂ O
11	H ₂ O	7	17	27	INF2	45	55	H ₂ O
12	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O

Εικόνα 14. Ακριβής καταγραφή των τιμών απορρόφησης (OD₄₀₅) της πλάκας.

Mios junior :E 03 / 18 / 03 11 : 19 : 30

READ MODE : A to H

ABSORBANCE MODE 8 PAGE 1 03 / 18 / 03 11 : 21 : 06

LOT NUMBER : _____ EXP. DATE : _____ ANALYST : _____

WAVELENGTHS = 405 NM

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	0.290	0.264	0.266	0.260	0.256	0.280	0.261	0.285
2	0.266	0.412	0.396	0.403	0.482	0.425	0.421	0.260
3	0.257	0.397	0.523	0.573	0.517	0.442	0.378	0.263
4	0.265	3.075	0.551	0.516	0.456	0.383	0.448	0.268
5	0.264	0.487	0.559	0.457	0.513	0.447	0.418	0.265
6	0.292	0.453	0.545	0.501	0.421	0.395	0.408	0.273
7	0.271	0.427	0.498	0.459	0.432	0.522	0.435	0.294
8	0.289	0.605	0.493	0.432	0.481	0.466	0.384	0.294
9	0.275	0.625	0.592	0.454	0.542	0.559	0.547	0.294
10	0.296	0.465	0.408	0.443	0.393	0.422	0.400	0.301
11	0.287	0.492	0.489	0.471	3.081	0.408	0.530	0.296
12	0.309	0.290	0.282	0.272	0.287	0.274	0.246	0.345

Πίνακας 8. Φυτά πατάτας και καπνού, τα οποία ελέγχθηκαν (Επανάληψη Β) με τη δοκιμή ELISA. Η αρίθμηση των δειγμάτων (1 – 55) αντιστοιχεί στις αριθμημένες υποδοχές – κυψελίδες της πλάκας ELISA (Εικόνα 13 και 14).

Αριθμός δειγμάτων	Γαμετόκλωνος	Φυτό	Αριθμός Δειγμάτων	Γαμετόκλωνος	Φυτό
No 1	H2-258-23 Θ.Α.	Πατάτα	No 28	F1-15-3 Θ.Α.	Πατάτα
No 2	H2-258-23 Θ.Α.	Καπνός	No 29	F1-15-3 Θ.Α.	Καπνός
No 3	H2-258-40 Θ.Α.	Καπνός	No 30	F1-15-3 Θ.Α.	Καπνός
No 4	H2-258-45 Θ.Α.	Καπνός	No 31	F1-15-3 Θ.Α.	Πατάτα
No 5	H2-258-54 Θ.Α.	Πατάτα	No 32	F1-15-3 Θ.Α.	Καπνός
No 6	H2-258-54 Θ.Α.	Καπνός	No 33	F1-15-3 Θ.Α.	Πατάτα
No 7	H2-258-54 Θ.Α.	Πατάτα	No 34	F1-15-3 Θ.Α.	Καπνός
No 8	H2-258-54 Θ.Α.	Καπνός	No 35	F1-15-3 Θ.Α.	Καπνός
No 9	H2-258-54 Θ.Α.	Πατάτα	No 36	F1-15-3 Θ.Α.	Πατάτα
No 10	H2-258-54 Θ.Α.	Καπνός	No 37	F1-15-3 Θ.Α.	Καπνός
No 11	H2-258-54 Θ.Α.	Πατάτα	No 38	F1-15-3 Θ.Α.	Καπνός
No 12	H2-258-54 Θ.Α.	Καπνός	No 39	F1-15-3 Θ.Α.	Πατάτα
No 13	H2-258-54 Θ.Α.	Καπνός	No 40	F1-15-3 Θ.Α.	Καπνός
No 14	F1-15-2 Θ.Α.	Πατάτα	No 41	F1-15-10 Θ.Α.	Πατάτα
No 15	F1-15-2 Θ.Α.	Καπνός	No 42	F1-15-10 Θ.Α.	Καπνός
No 16	F1-15-2 Θ.Α.	Πατάτα	No 43	F1-15-10 Θ.Α.	Καπνός
No 17	F1-15-2 Θ.Α.	Καπνός	No 44	F1-15-10 Θ.Α.	Καπνός
No 18	F1-15-2 Θ.Α.	Πατάτα	No 45	F1-15-10 Θ.Α.	Καπνός
No 19	F1-15-2 Θ.Α.	Καπνός	No 46	F1-15-10 Θ.Α.	Πατάτα
No 20	F1-15-2 Θ.Α.	Πατάτα	No 47	F1-15-10 Θ.Α.	Καπνός
No 21	F1-15-2 Θ.Α.	Καπνός	No 48	F1-15-12 Θ.Α.	Πατάτα
No 22	F1-15-2 Θ.Α.	Πατάτα	No 49	F1-15-12 Θ.Α.	Καπνός
No 23	F1-15-2 Θ.Α.	Καπνός	No 50	F1-15-12 Θ.Α.	Πατάτα
No 24	F1-15-2 Θ.Α.	Πατάτα	No 51	F1-15-12 Θ.Α.	Καπνός
No 25	F1-15-2 Θ.Α.	Καπνός	No 52	F1-15-13 Θ.Α.	Καπνός
No 26	F1-15-2 Θ.Α.	Πατάτα	No 53	F1-15-13 Θ.Α.	Πατάτα
No 27	F1-15-2 Θ.Α.	Καπνός	No 54	F1-15-13 Θ.Α.	Καπνός
			No 55	F1-15-14 Θ.Α.	Πατάτα

Επανάληψη Γ

Εικόνα 15. Σχηματική παράσταση της πλάκας ELISA, όπου EB = Ρυθμιστικό εξαγωγής (extraction buffer), H 1 = Υγιής μάρτυρας 1, H 2 = Υγιής μάρτυρας 2, INF1 = Μολυσμένος μάρτυρας 1, INF2 = Μολυσμένος μάρτυρας 2 και 1 – 52 δείγματα υπό έλεγχο.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
2	H ₂ O	EB	8	18	28	36	46	H ₂ O
3	H ₂ O	H 1	9	19	29	37	47	H ₂ O
4	H ₂ O	INF1	10	20	30	38	48	H ₂ O
5	H ₂ O	1	11	21	31	39	49	H ₂ O
6	H ₂ O	2	12	22	32	40	50	H ₂ O
7	H ₂ O	3	13	23	33	41	51	H ₂ O
8	H ₂ O	4	14	24	34	42	52	H ₂ O
9	H ₂ O	5	15	25	35	43	H ₂ O	H ₂ O
10	H ₂ O	6	16	26	H 2	44	H ₂ O	H ₂ O
11	H ₂ O	7	17	27	INF2	45	H ₂ O	H ₂ O
12	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O

Εικόνα 16. Ακριβής καταγραφή των τιμών απορρόφησης (OD₄₀₅) της πλάκας.

Mios junior :E 04 / 15 / 03 13 : 29 : 29

READ MODE : A to H

ABSORBANCE MODE 8 PAGE 1 04 / 15 / 03 13 : 29 : 42

LOT NUMBER : _____ EXP. DATE : _____ ANALYST : _____

WAVELENGTHS = 405 NM

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	0.406	0.408	0.419	0.419	0.394	0.392	0.400	0.401
2	0.434	0.953	0.817	0.868	0.935	0.892	0.800	0.376
3	0.408	0.744	0.775	0.889	0.793	0.932	0.728	0.370
4	0.397	2.219	0.766	0.934	0.861	0.828	0.798	0.377
5	0.398	0.745	0.734	0.938	0.830	0.852	0.738	0.414
6	0.451	0.787	0.831	0.821	1.045	0.528	0.776	0.402
7	0.442	0.849	0.688	1.057	0.862	0.929	0.827	0.390
8	0.457	0.809	0.845	0.833	0.880	0.897	0.838	0.427
9	0.446	0.848	0.902	0.852	1.046	0.804	0.386	0.388
10	0.437	0.683	0.834	0.949	0.795	0.956	0.383	0.424
11	0.400	0.729	0.796	0.952	2.059	0.999	0.375	0.400
12	0.404	0.395	0.385	0.375	0.400	0.398	0.396	0.396

Πίνακας 9. Φυτά πατάτας και καπνού, τα οποία ελέγχθηκαν (Επανάληψη Γ) με τη δοκιμή ELISA. Η αρίθμηση των δειγμάτων (1 – 55) αντιστοιχεί στις αριθμημένες υποδοχές – κυψελίδες της πλάκας ELISA (Εικόνα 15 και 16).

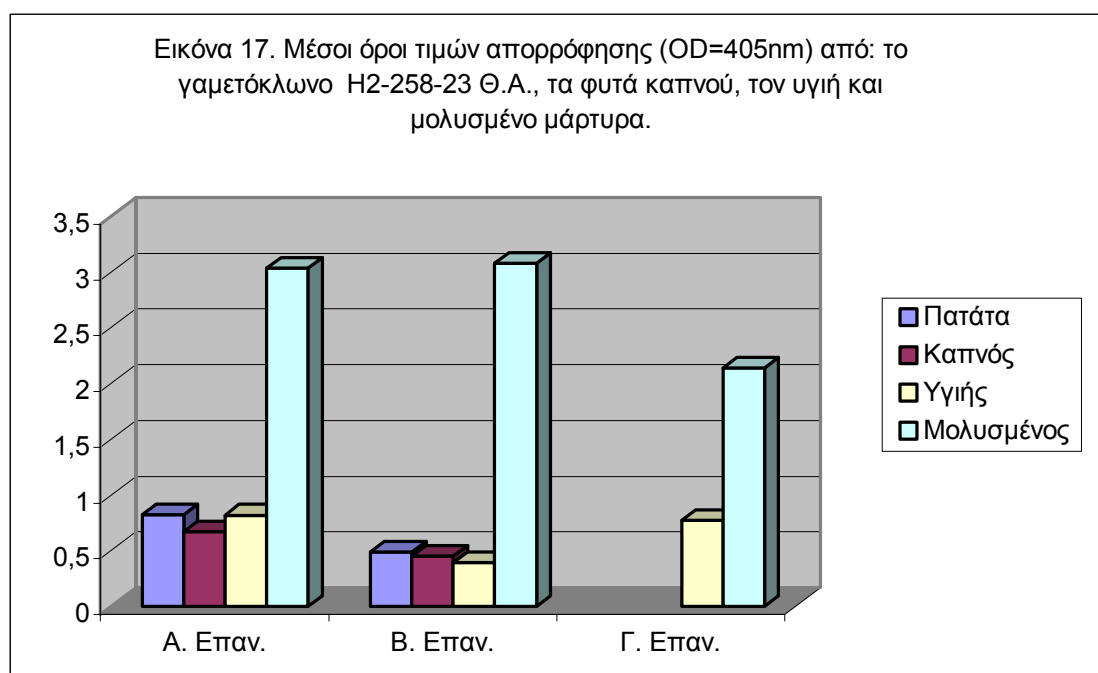
Αριθμός δειγμάτων	Γαμετόκλωνος	Φυτό	Αριθμός Δειγμάτων	Γαμετόκλωνος	Φυτό
No 1	F1-15-14 Θ.Α.	Καπνός	No 28	F1-15-3 Θ.Α.	Πατάτα
No 2	F1-15-15 Θ.Α.	Καπνός	No 29	F1-15-3 Θ.Α.	Πατάτα
No 3	F1-15-15 Θ.Α.	Καπνός	No 30	F1-15-3 Θ.Α.	Πατάτα
No 4	F1-15-4 Θ.	Καπνός	No 31	F1-15-3 Θ.Α.	Πατάτα
No 5	F1-15-4 Θ.	Καπνός	No 32	F1-15-3 Θ.Α.	Πατάτα
No 6	Sebago	Πατάτα	No 33	F1-15-10 Θ.Α.	Πατάτα
No 7	Sebago	Καπνός	No 34	F1-15-10 Θ.Α.	Πατάτα
No 8	Sebago	Πατάτα	No 35	F1-15-10 Θ.Α.	Πατάτα
No 9	Sebago	Καπνός	No 36	F1-15-12 Θ.Α.	Πατάτα
No 10	Sebago	Πατάτα	No 37	F1-15-12 Θ.Α.	Πατάτα
No 11	Sebago	Καπνός	No 38	F1-15-12 Θ.Α.	Πατάτα
No 12	Sebago	Πατάτα	No 39	F1-15-12 Θ.Α.	Πατάτα
No 13	Sebago	Καπνός	No 40	F1-15-12 Θ.Α.	Πατάτα
No 14	H2-258-43 Θ.Α.	Πατάτα	No 41	F1-15-13 Θ.Α.	Πατάτα
No 15	H2-258-43 Θ.Α.	Πατάτα	No 42	F1-15-14 Θ.Α.	Πατάτα
No 16	H2-258-54 Θ.Α.	Πατάτα	No 43	F1-15-14 Θ.Α.	Πατάτα
No 17	H2-258-54 Θ.Α.	Πατάτα	No 44	F1-15-15 Θ.Α.	Πατάτα
No 18	H2-258-54 Θ.Α.	Πατάτα	No 45	F1-15-15 Θ.Α.	Πατάτα
No 19	H2-258-54 Θ.Α.	Πατάτα	No 46	(2x-78c 11.5) ₁₈	Πατάτα
No 20	H2-258-54 Θ.Α.	Πατάτα	No 47	Sebago	Πατάτα
No 21	F1-15-2 Θ.Α.	Πατάτα	No 48	Sebago	Πατάτα
No 22	F1-15-2 Θ.Α.	Πατάτα	No 49	Sebago	Πατάτα
No 23	F1-15-2 Θ.Α.	Πατάτα	No 50	Sebago	Πατάτα
No 24	F1-15-2 Θ.Α.	Πατάτα	No 51	Sebago	Πατάτα
No 25	F1-15-2 Θ.Α.	Πατάτα	No 52	Sebago	Πατάτα
No 26	F1-15-2 Θ.Α.	Πατάτα	No 53	H ₂ O	
No 27	F1-15-3 Θ.Α.	Πατάτα	No 54	H ₂ O	
			No 55	H ₂ O	

Λαμβάνοντας υπόψη τη συμπεριφορά κάθε γαμετόκλωνου έναντι της φυλής Y^N του PVY προκύπτει, ότι οι γαμετόκλωνοι που προήλθαν από το υβρίδιο F1-15 έδωσαν τις μικρότερες τιμές απορρόφησης, ιδιαίτερα στην Β επανάληψη.

Συγκεκριμένα όσο αφορά τη συμπεριφορά του H2-258-23 Θ.Α. καταγράφηκαν τιμές απορρόφησης 0,821 και 0,487 για την Α και Β επανάληψη, αντίστοιχα. Σχετικά μικρότερες ήταν και οι τιμές απορρόφησης στα φυτά του καπνού 0,669 και 0,453 για την Α και Β επανάληψη αντίστοιχα (Πίνακας 10, Εικόνα 17).

Πίνακας 10. Καταγραφή των τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από την αξιολόγηση του γαμετόκλωνου H2-258-23 Θ. Α. έναντι της φυλής Y^N του PVY.

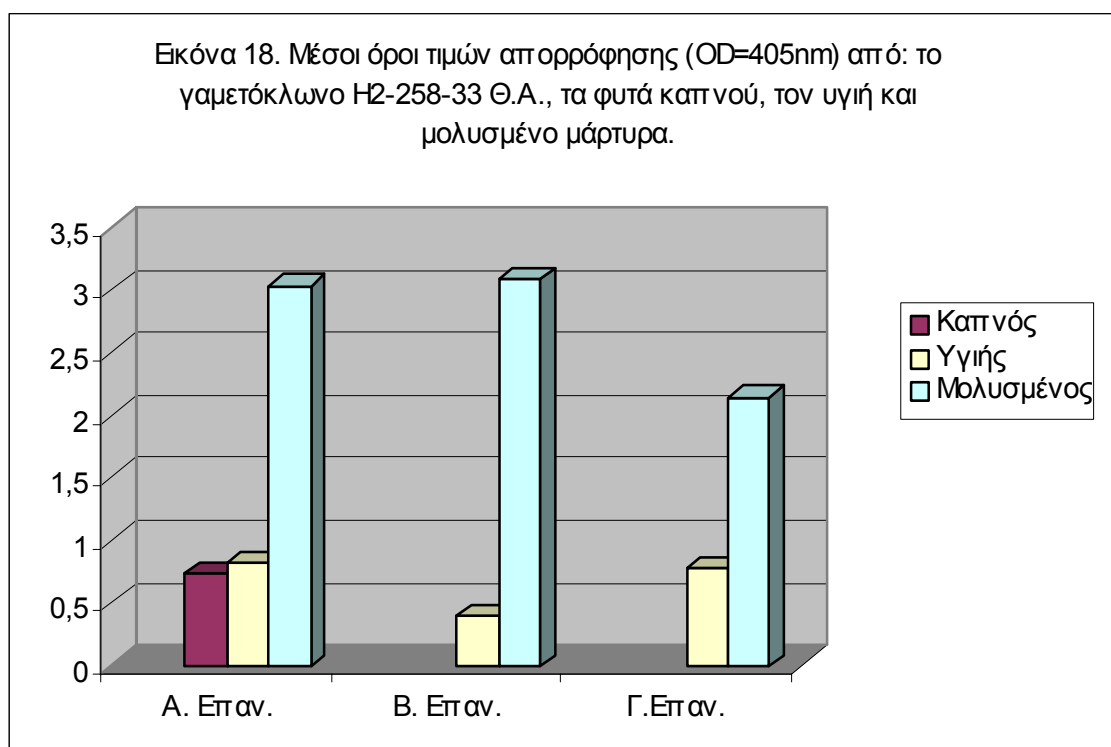
Γαμετόκλωνος	Απορρόφηση (OD=405nm)					
	Α. Επανάληψη		Β. Επανάληψη		Γ. Επανάληψη	
	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός
H2-258-23 Θ.Α.	0 . 664	0 . 669	0 . 487	0 . 453	-	-
H2-258-23 Θ.Α.	0 . 845	-	-	-	-	-
H2-258-23 Θ.Α.	0 . 955	-	-	-	-	-
Μ. Ο.	0 . 821	0 . 669	0 . 487	0 . 453	-	-



Σχετικά με τον γαμετόκλωνο H2-258-33 Θ.Α. πραγματοποιήθηκε μία μόνο επανάληψη και αυτή σε φυτά καπνού. Η τιμή απορρόφησης (0,739) ήταν μικρότερη από την τιμή απορρόφησης του υγιούς μάρτυρα (0,819), ενώ ο μολυσμένος μάρτυρας έδωσε πολύ υψηλότερη τιμή (3,033) (Πίνακας 11, Εικόνα 18).

Πίνακας 11. Καταγραφή των τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από την αξιολόγηση του γαμετόκλωνου H2-258-33 Θ. Α. έναντι της φυλής Y^N του PVY.

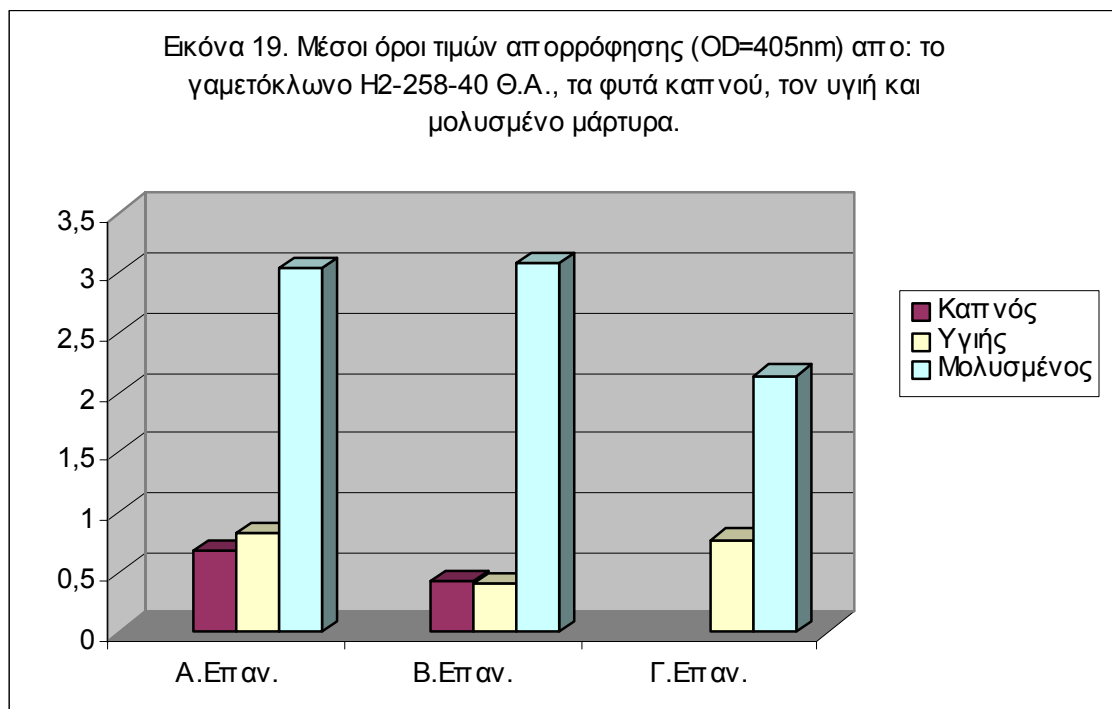
Γαμετόκλωνος	Απορρόφηση (OD=405nm)					
	Α. Επανάληψη		Β. Επανάληψη		Γ. Επανάληψη	
	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός
H2-258-33 Θ.Α.	-	0 . 762	-	-	-	-
H2-258-33 Θ.Α.	-	0 . 716	-	-	-	-
Μ. Ο.	-	0 . 739	-	-	-	-



Και οι δύο επαναλήψεις του γαμετοκλώνου H2-258-40 Θ.Α. αφορούσαν φυτά καπνού και καταγράφηκαν τιμές απορρόφησης 0,673 και 0,427 αντίστοιχα για την Α και Β επανάληψη. Οι τιμές αυτές ήταν μικρότερες σε σχέση με εκείνες του μολυσμένου μάρτυρα (3,033 και 3,078), ενώ κυμαίνονταν στα ίδια περίπου επίπεδα με εκείνες του υγιή (Πίνακας 12, Εικόνα 19).

Πίνακας 12. Καταγραφή των τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από την αξιολόγηση του γαμετοκλώνου H2-258-40 Θ. Α. έναντι της φυλής Y^N του PVY.

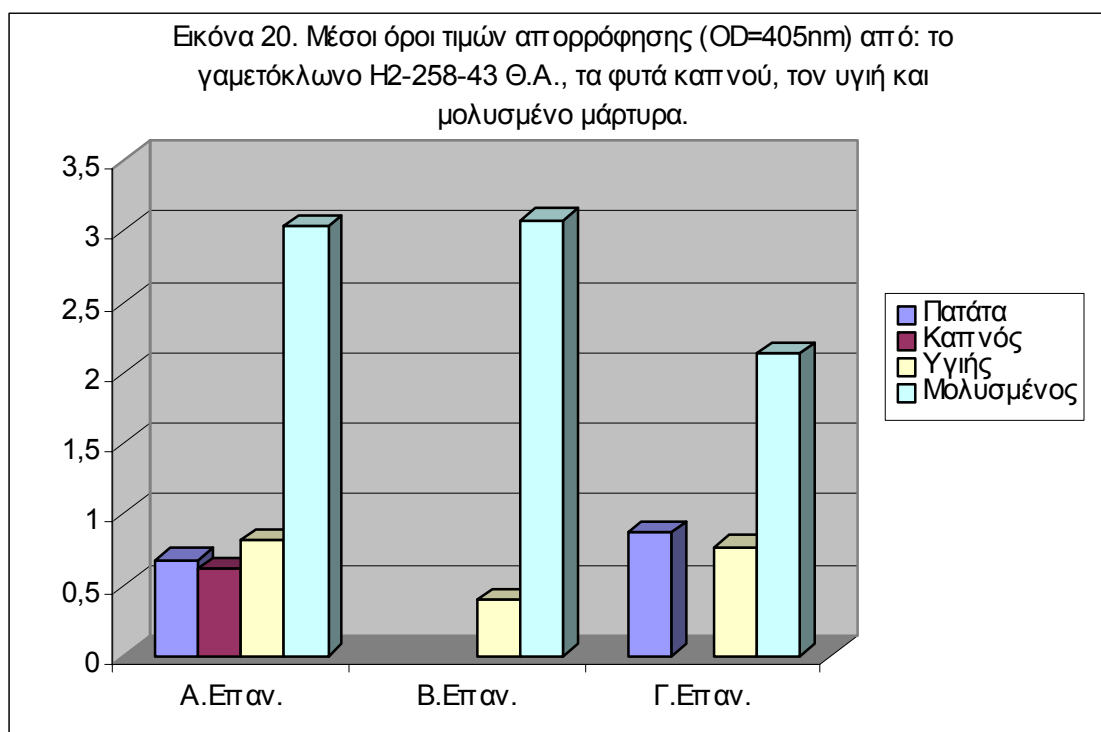
Γαμετόκλωνος	Απορρόφηση (OD=405nm)					
	Α. Επανάληψη		Β. Επανάληψη		Γ. Επανάληψη	
	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός
H2-258-40 Θ.Α.	-	0 . 673	-	0 . 427	-	-



Οι τιμές απορρόφησης για το γαμετόκλωνο H2-258-43 Θ.Α. ήταν 0,680 στην Α και 0,873 στην Γ επανάληψη. Φυτά καπνού αξιολογήθηκαν μόνο στην Α επανάληψη και κατεγράφει τιμή απορρόφησης 0,619. Οι τιμές απορρόφησης του μολυσμένου μάρτυρα ήταν 3,033 στην Α και 2,139 στην Γ επανάληψη, ενώ του υγιή μάρτυρα ήταν πολύ χαμηλότερες (0,819 και 0,769) (Πίνακας 13, Εικόνα 20).

Πίνακας 13. Καταγραφή των τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από την αξιολόγηση του γαμετόκλωνου H2-258-43 Θ. Α. έναντι της φυλής Y^N του PVY.

Γαμετόκλωνος	Απορρόφηση (OD=405nm)					
	Α. Επανάληψη		Β. Επανάληψη		Γ. Επανάληψη	
	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός
H2-258-43 Θ.Α.	0 . 717	0 . 619	-	-	0 . 845	-
H2-258-43 Θ.Α.	0 . 644	-	-	-	0 . 902	-
Μ. Ο.	0 . 680	0 . 619	-	-	0 . 873	-

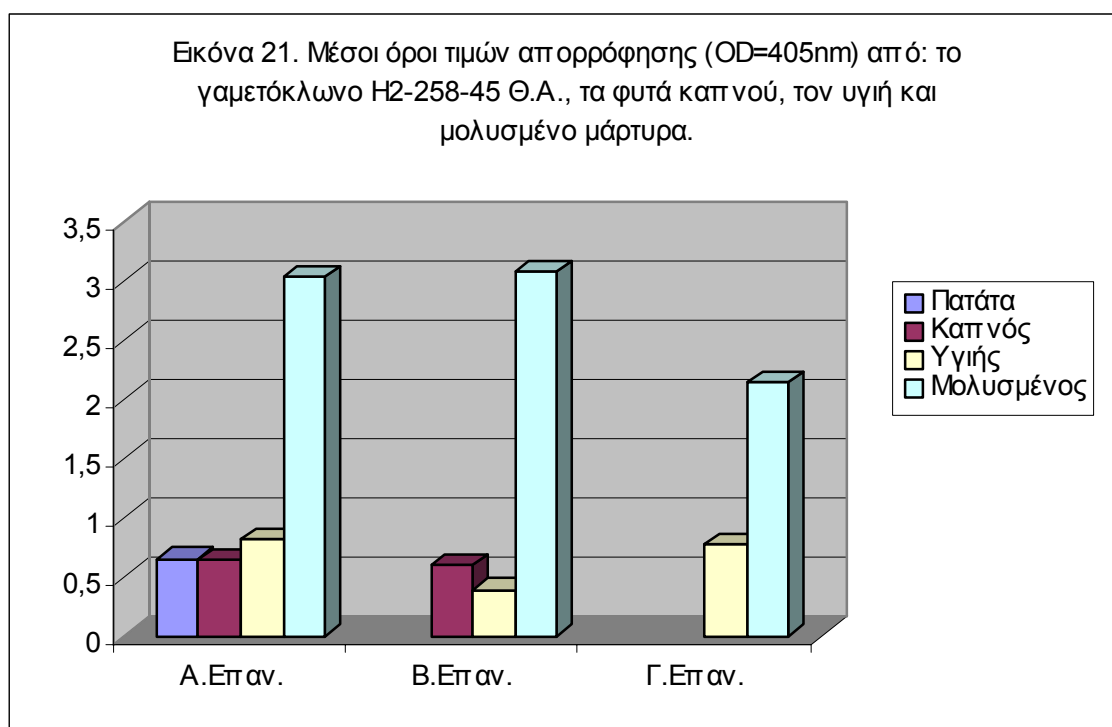


Από την αξιολόγηση του γαμετόκλωνου H2-258-45 Θ.Α. (σε δύο επαναλήψεις) προέκυψαν τιμές απορρόφησης για τα φυτά πατάτας 0,657 στην Α επανάληψη, ενώ για τα φυτά καπνού 0,642 και 0,605 στην Α και Β επανάληψη, αντίστοιχα. Οι παραπάνω τιμές ήταν πολύ μικρότερες από εκείνες των μολυσμένων μαρτύρων (Πίνακας 14, Εικόνα 21).

Πίνακας 14. Καταγραφή των τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από την αξιολόγηση του γαμετόκλωνου H2-258-45 Θ. Α. έναντι της φυλής Υ^N του PVY.

Γαμετόκλωνος	Απορρόφηση (OD=405nm)					
	Α. Επανάληψη		Β. Επανάληψη		Γ. Επανάληψη	
	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός
H2-258-45 Θ.Α.	0 . 657	0 . 642	-	0 . 605	-	-

Εικόνα 21. Μέσοι όροι τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από: το γαμετόκλωνο H2-258-45 Θ.Α., τα φυτά καπνού, τον υγιή και μολυσμένο μάρτυρα.

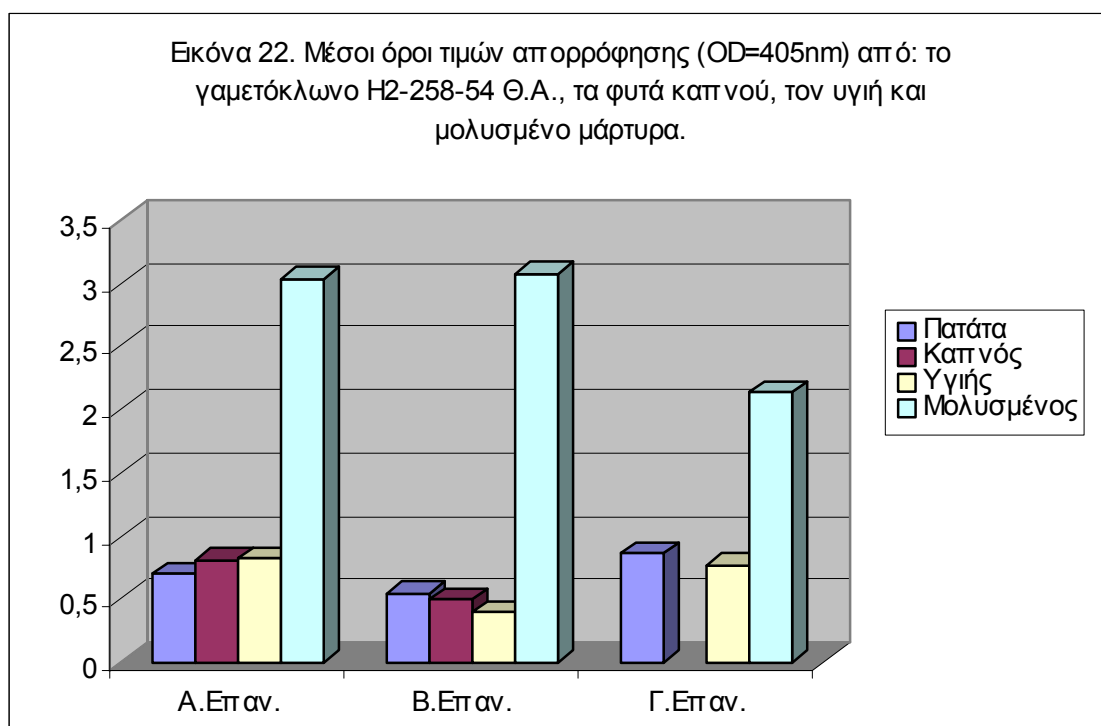


Ο Μ. Ο. απορρόφησης για το γαμετόκλωνο H2-258-54 Θ.Α. ήταν 0,700, 0,549 και 0,864 στην Α, Β και Γ επανάληψη, αντίστοιχα, ενώ για τα φυτά καπνού ήταν 0,813 και 0,491 στην Α και Β επανάληψη, αντίστοιχα. Και στην περίπτωση αυτή ο μολυσμένος μάρτυρας έδωσε τιμές απορρόφησης εξαιρετικά υψηλότερες, σε σχέση με εκείνες του υγιούς, αλλά και των δειγμάτων πατάτας και καπνού. (Πίνακας 15, Εικόνα 22).

Πίνακας 15. Καταγραφή των τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από την αξιολόγηση του γαμετόκλωνου H2-258-54 Θ. Α. έναντι της φυλής Y^N του PVY.

Γαμετόκλωνος	Απορρόφηση (OD=405nm)					
	Α. Επανάληψη		Β. Επανάληψη		Γ. Επανάληψη	
	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός
H2-258-54 Θ.Α.	0 . 706	0 . 813	0 . 625	0 . 465	0 . 834	-
H2-258-54 Θ.Α.	0 . 644	-	0 . 492	0 . 396	0 . 796	-
H2-258-54 Θ.Α.	0 . 644	-	0 . 523	0 . 551	0 . 868	-
H2-258-54 Θ.Α.	0 . 807	-	0 . 559	0 . 545	0 . 889	-
H2-258-54 Θ.Α.	-	-	-	0 . 498	0 . 934	-
Μ. Ο.	0 . 700	0 . 813	0 . 549	0 . 491	0 . 864	-

Εικόνα 22. Μέσοι όροι τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από: το γαμετόκλωνο H2-258-54 Θ.Α., τα φυτά καπνού, τον υγιή και μολυσμένο μάρτυρα.

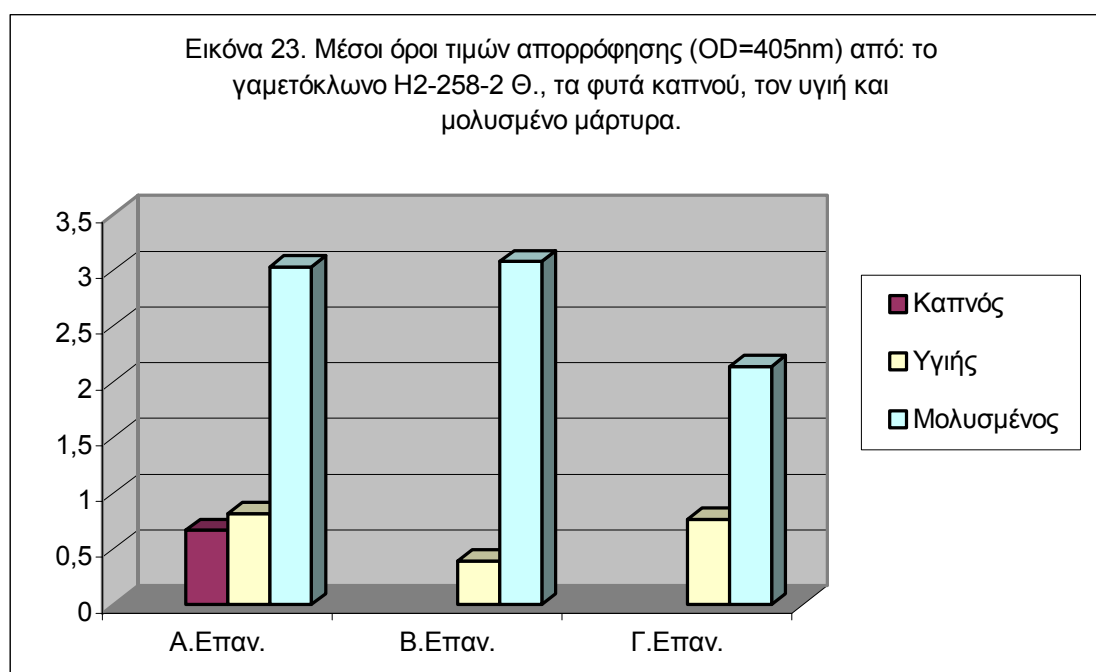


Στον γαμετόκλωνο H-258-2 Θ. πραγματοποιήθηκε μία μόνο επανάληψη, η οποία μάλιστα έγινε σε φυτά καπνού και έδωσε τιμή απορρόφησης 0,668, αρκετά μικρότερη από εκείνη του μολυσμένου μάρτυρα 3,033 (Πίνακας 16, Εικόνα 23).

Πίνακας 16. Καταγραφή των τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από την αξιολόγηση του γαμετόκλωνου H2-258-2 Θ. έναντι της φυλής Y^N του PVY.

Γαμετόκλωνος	Απορρόφηση (OD=405nm)					
	Α. Επανάληψη		Β. Επανάληψη		Γ. Επανάληψη	
	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός
H2-258-2 Θ.	-	0 . 620	-	-	-	-
H2-258-2 Θ.	-	0 . 716	-	-	-	-
Μ. Ο.	-	0 . 668	-	-	-	-

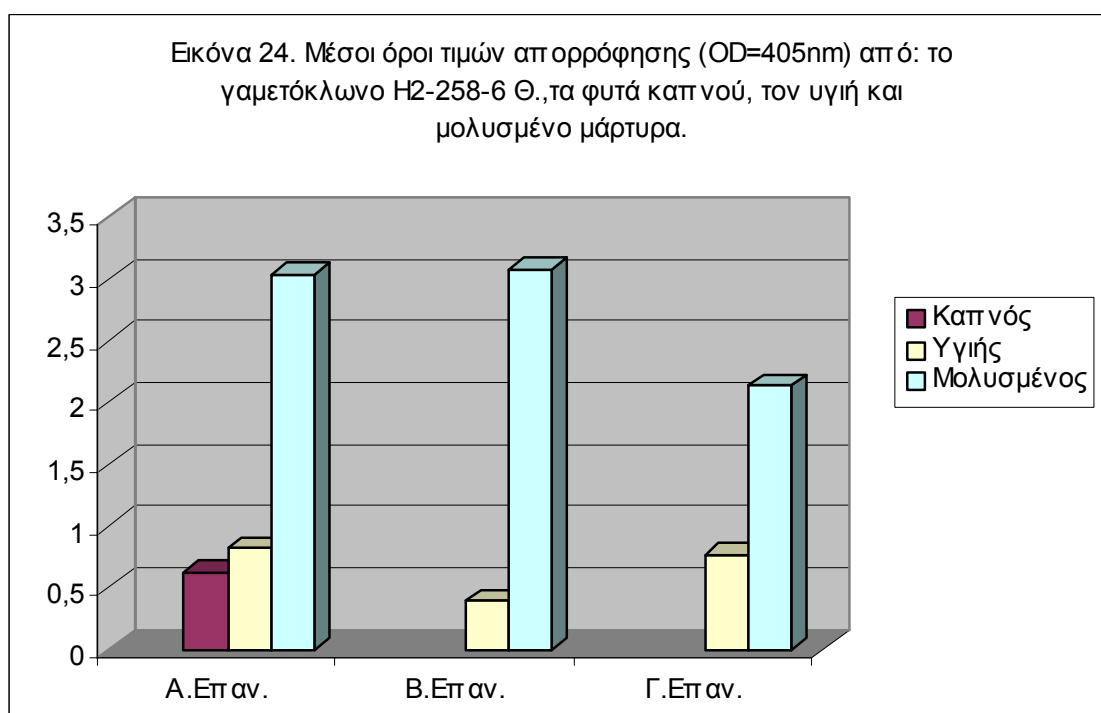
Εικόνα 23. Μέσοι όροι τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από: το γαμετόκλωνο H2-258-2 Θ., τα φυτά καπνού, τον υγιή και μολυσμένο μάρτυρα.



Ομοίως στον γαμετόκλωνο H2-258-6 Θ. πραγματοποιήθηκε μια επανάληψη σε φυτά καπνού. Η τιμή απορρόφησης (0,622) ήταν πολύ μικρότερη από εκείνη του μολυσμένου μάρτυρα (3,033) (Πίνακας 17, Εικόνα 24).

Πίνακας 17. Καταγραφή των τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από την αξιολόγηση του γαμετόκλωνου H2-258-6 Θ. έναντι της φυλής Y^N του PVY.

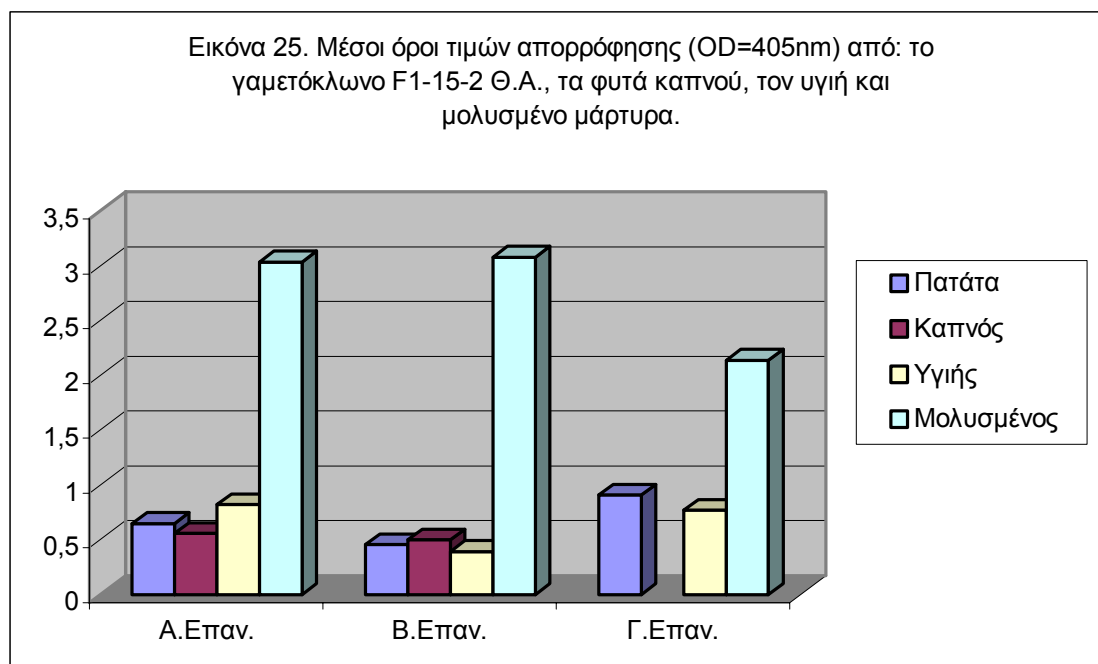
Γαμετόκλωνος	Απορρόφηση (OD=405nm)					
	Α. Επανάληψη		Β. Επανάληψη		Γ. Επανάληψη	
	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός
H2-258-6 Θ.	-	0 . 653	-	-	-	-
H2-258-6 Θ.	-	0 . 591	-	-	-	-
Μ .Ο.	-	0 . 622	-	-	-	-



Με βάση τα δεδομένα του παρακάτω πίνακα που αφορούν τον γαμετοκλώνο F1-15-2 Θ.Α. προκύπτει ότι οι τιμές απορρόφησης που καταγράφηκαν στην Α, Β και Γ επανάληψη ήταν 0,649, 0,456 και 0,908, αντίστοιχα. Αντίθετα οι τιμές απορρόφησης για τα φυτά καπνού ήταν 0,557 για την Α και 0,499 για την Γ επανάληψη. Από την εικόνα 25 φαίνεται, ότι και στην περίπτωση αυτή οι τιμές απορρόφησης των μολυσμένων μαρτύρων ήταν πολύ μεγαλύτερες (2.139, 3.078) (Πίνακας 18, Εικόνα 25).

Πίνακας 18. Καταγραφή των τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από την αξιολόγηση του γαμετοκλώνου F1-15-2 Θ.Α. έναντι της φυλής Y^N του PVY.

Γαμετοκλώνος	Απορρόφηση (OD=405nm)					
	Α. Επανάληψη		Β. Επανάληψη		Γ. Επανάληψη	
	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός
F1-15-2 Θ.Α.	0 . 611	0 . 557	0 . 493	0 . 592	0 . 938	-
F1-15-2 Θ.Α.	0 . 688	-	0 . 408	0 . 489	0.821	-
F1-15-2 Θ.Α.	-	-	0 . 403	0 . 573	1 . 057	-
F1-15-2 Θ.Α.	-	-	0 . 516	0 . 457	0 . 833	-
F1-15-2 Θ.Α.	-	-	0 . 501	0 . 459	0 . 852	-
F1-15-2 Θ.Α.	-	-	0 . 432	0 . 454	0 . 949	-
F1-15-2 Θ.Α.	-	-	0 . 443	0 . 471	-	-
Μ. Ο.	0 . 649	0 . 557	0 . 456	0 . 499	0 . 908	-

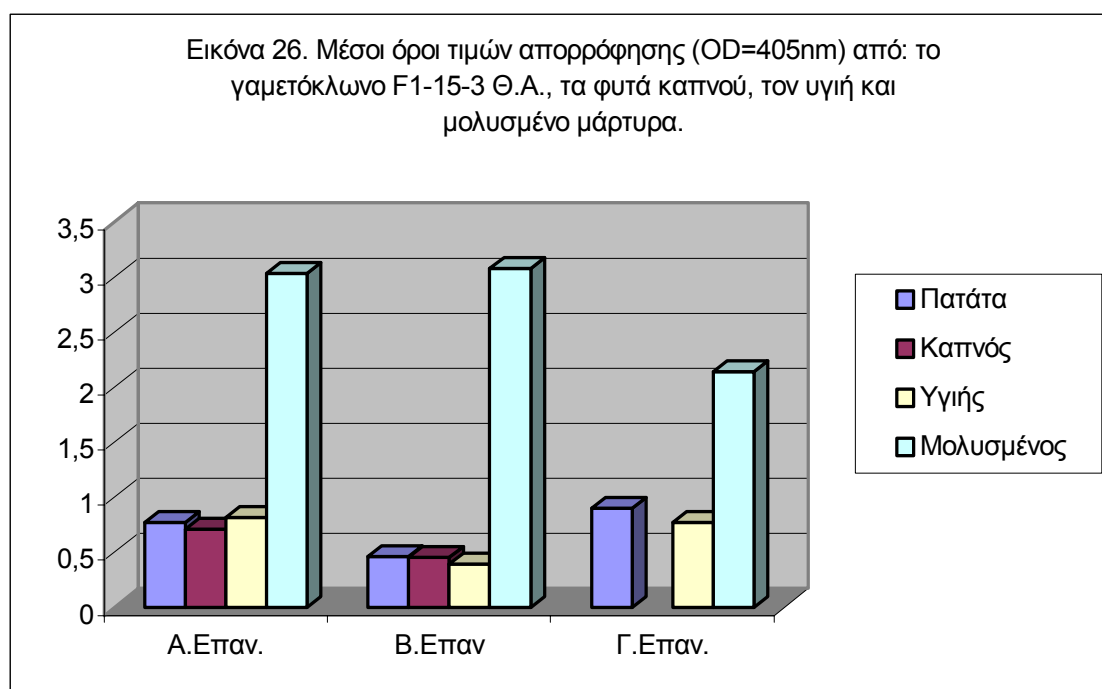


Ο γαμετοκλώνος F1-15-3 Θ.Α. αξιολογήθηκε έναντι του PVY σε τρεις επαναλήψεις. Οι Μ. Ο. των τιμών απορρόφησης ήταν 0,771, 0,459 και 0,902 για την Α, Β και Γ επανάληψη, αντίστοιχα. Στα φυτά καπνού οι τιμές απορρόφησης ήταν 0,710 για την Α και 0,454 για την Β επανάληψη ενώ εκείνες των μολυσμένων μαρτύρων ήταν πολύ υψηλότερες (3,033, 3,078 και 2,139) (Πίνακας 19, Εικόνα 26).

Πίνακας 19. Καταγραφή των τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από την αξιολόγηση του γαμετόκλωνου F1-15-3 Θ.Α. έναντι της φυλής Y^N του PVY.

Γαμετόκλωνος	Απορρόφηση (OD=405nm)					
	Α. Επανάληψη		Β. Επανάληψη		Γ. Επανάληψη	
	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός
F1-15-3 Θ.Α.	0 . 766	0 . 710	0 . 482	0 . 517	0 . 952	-
F1-15-3 Θ.Α.	0 . 784	-	0 . 513	0 . 456	0 . 935	-
F1-15-3 Θ.Α.	0 . 763	-	0 . 432	0 . 421	0 . 793	-
F1-15-3 Θ.Α.	-	-	0 . 425	0 . 481	0 . 861	-
F1-15-3 Θ.Α.	-	-	0 . 447	0 . 542	0 . 830	-
F1-15-3 Θ.Α.	-	-	-	0 . 442	1 . 045	-
F1-15-3 Θ.Α.	-	-	-	0 . 383	-	-
F1-15-3 Θ.Α.	-	-	-	0 . 395	-	-
Μ. Ο.	0 . 771	0 . 710	0 . 459	0 . 454	0 . 902	-

Εικόνα 26. Μέσοι όροι τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από: το γαμετόκλωνο F1-15-3 Θ.Α., τα φυτά καπνού, τον υγιή και μολυσμένο μάρτυρα.

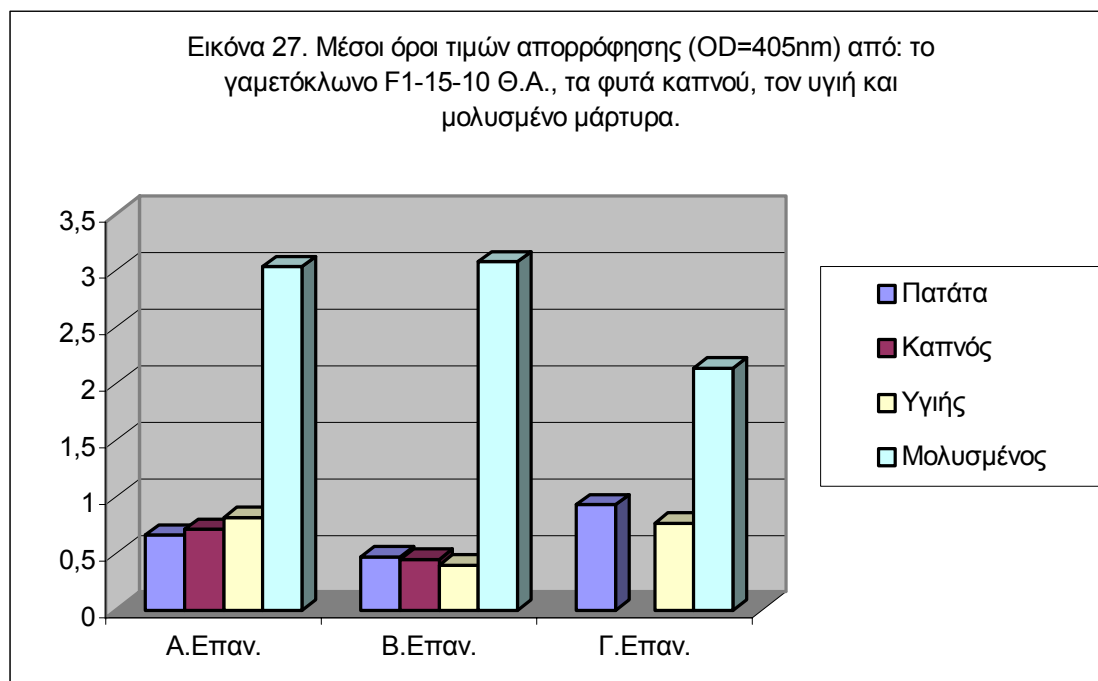


Στον γαμετοκλώνο F1-15-10 Θ.Α. πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις με τιμές απορρόφησης 0,663, 0,471 και 0,929 αντίστοιχα για την Α, Β και Γ επανάληψη. Ομοίως τα φυτά καπνού και στις δύο επαναλήψεις έδωσαν μικρές τιμές απορρόφησης (0,446 και 0,712) σε σχέση με εκείνες του μολυσμένου μάρτυρα (2,139 και 0,819) (Πίνακας 20, Εικόνα 27).

Πίνακας 20. Καταγραφή των τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από την αξιολόγηση του γαμετόκλωνου F1-15-10 Θ.Α. έναντι της φυλής Υ^N του PVY.

Γαμετόκλωνος	Απορρόφηση (OD=405nm)					
	Α. Επανάληψη		Β. Επανάληψη		Γ. Επανάληψη	
	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός
F1-15-10 Θ.Α.	0 . 614	0 . 712	0 . 522	0 . 466	0 . 862	-
F1-15-10 Θ.Α.	0 . 713	-	0 . 421	0 . 559	0 . 880	-
F1-15-10 Θ.Α.	-	-	-	0 . 422	1 . 046	-
F1-15-10 Θ.Α.	-	-	-	0 . 408	-	-
F1-15-10 Θ.Α.	-	-	-	0 . 378	-	-
Μ. Ο.	0 . 663	0 . 712	0 . 471	0 . 446	0 . 929	-

Εικόνα 27. Μέσοι όροι τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από: το γαμετόκλωνο F1-15-10 Θ.Α., τα φυτά καπνού, τον υγιή και μολυσμένο μάρτυρα.

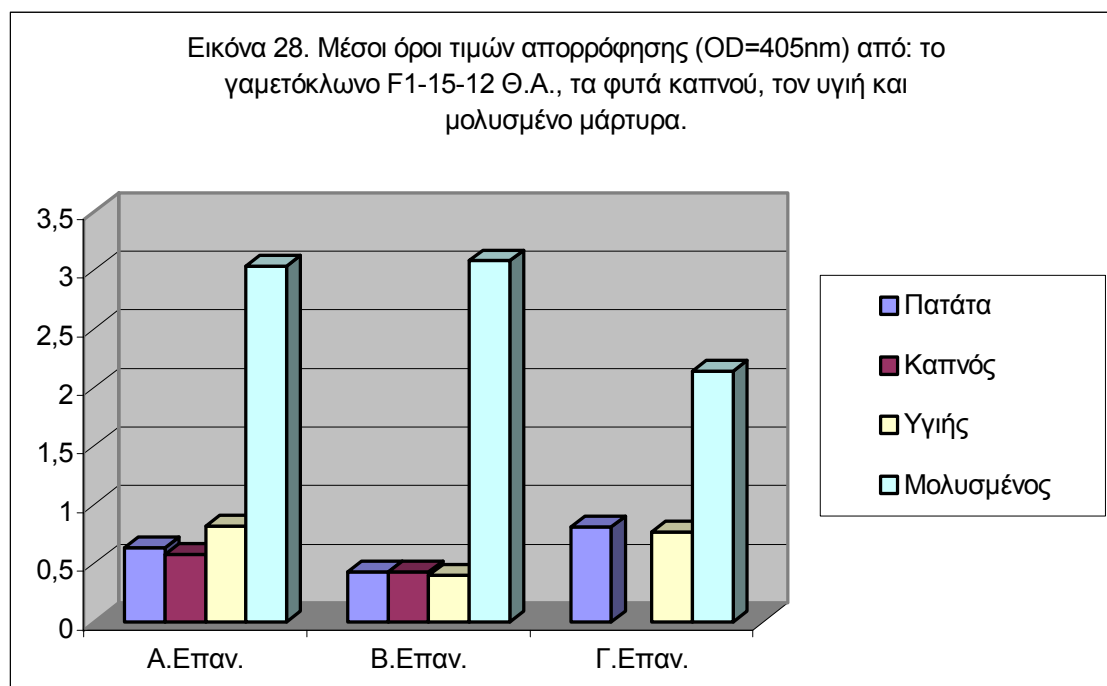


Στον γαμετοκλώνο F1-15-12 Θ.Α. πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις, με τιμές απορρόφησης 0,632, 0,428 και 0,806, αντίστοιχα. Στα φυτά καπνού καταγράφηκαν τιμές απορρόφησης 0,426 και 0,574 στην Α και Β επανάληψη, αντίστοιχα. Οι δύο μολυσμένοι μάρτυρες έδωσαν πολύ υψηλότερες τιμές (2,139 και 3,078) σε σχέση με εκείνες των υγιών μαρτύρων (0,395 και 0,819) (Πίνακας 21, Εικόνα 28).

Πίνακας 21. Καταγραφή των τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από την αξιολόγηση του γαμετόκλωνου F1-15-12 Θ.Α. έναντι της φυλής Υ^N του PVY.

Γαμετόκλωνος	Απορρόφηση (OD=405nm)					
	Α. Επανάληψη		Β. Επανάληψη		Γ. Επανάληψη	
	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός
F1-15-12 Θ.Α.	0 . 656	0 . 574	0 . 448	0 . 418	0 . 892	-
F1-15-12 Θ.Α.	0 . 609	-	0 . 408	0 . 435	0 . 932	-
F1-15-12 Θ.Α.	-	-	-	-	0 . 828	-
F1-15-12 Θ.Α.	-	-	-	-	0 . 852	-
F1-15-12 Θ.Α.	-	-	-	-	0 . 528	-
Μ .Ο.	0 . 632	0 . 574	0 . 428	0 . 426	0 . 806	-

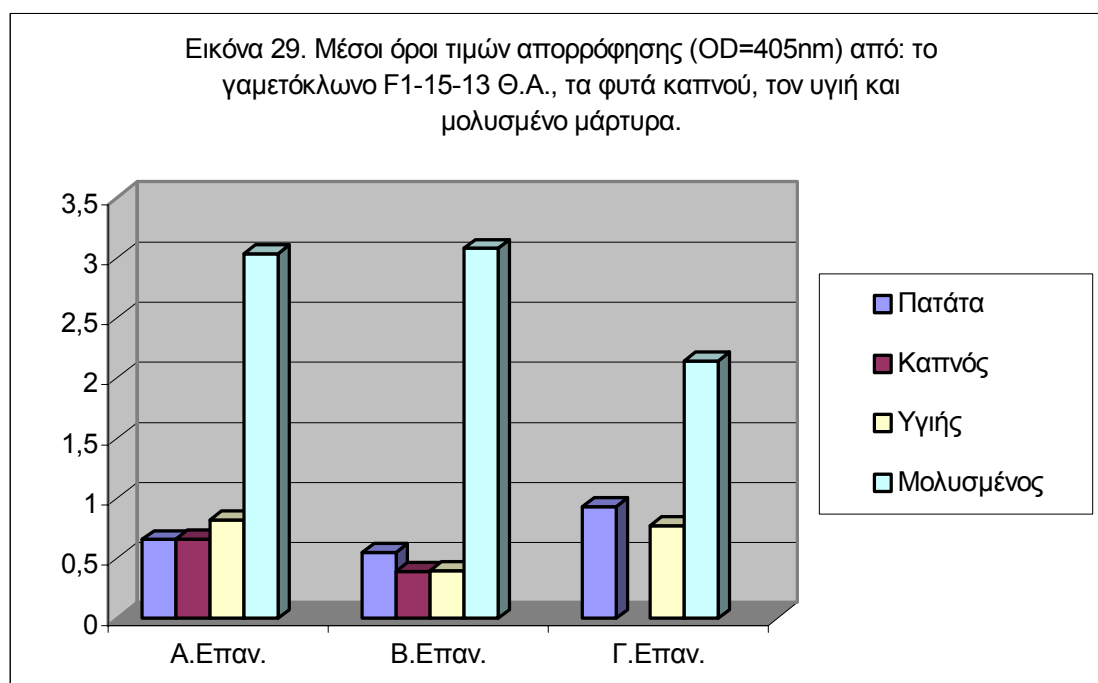
Εικόνα 28. Μέσοι όροι τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από: το γαμετόκλωνο F1-15-12 Θ.Α., τα φυτά καπνού, τον υγιή και μολυσμένο μάρτυρα.



Η συμπεριφορά του γαμετόκλωνου F1-15-13 Θ.Α. έναντι της φυλής Υ^N και στις τρεις επαναλήψεις εμφανίσθηκε με τιμές απορρόφησης πολύ μικρότερες (0,657, 0,547 και 0,929) σε σχέση με εκείνες του μολυσμένου μάρτυρα (3,033, 3,078 και 2,139). Τα φυτά καπνού συμπεριφέρθηκαν με ανάλογο τρόπο (τιμές απορρόφησης 0,658 και 0,392 για την Α και Β επανάληψη) (Πίνακας 22, Εικόνα 29).

Πίνακας 22. Καταγραφή των τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από την αξιολόγηση του γαμετόκλωνου F1-15-13 Θ.Α. έναντι της φυλής Υ^N του PVY.

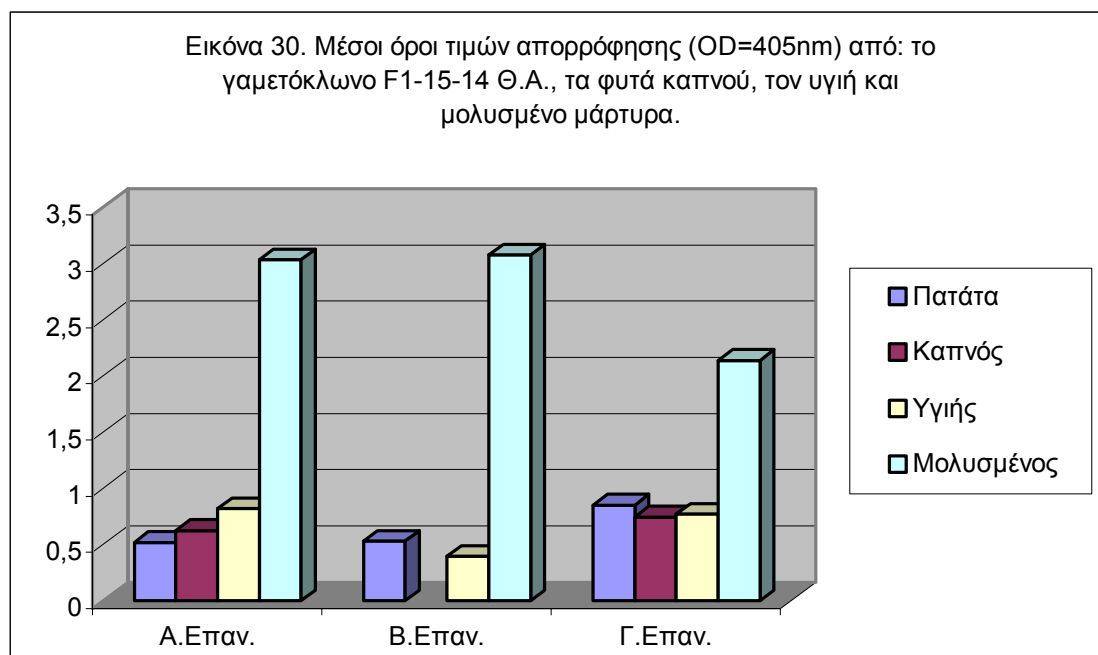
Γαμετόκλωνος	Απορρόφηση (OD=405nm)					
	Α. Επανάληψη		Β. Επανάληψη		Γ. Επανάληψη	
	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός
F1-15-13 Θ.Α.	0 . 657	0 . 668	0 . 547	0 . 384	0 . 929	-
F1-15-13 Θ.Α.	-	0 . 649	-	0 . 400	-	-
Μ. Ο.	0 . 657	0 . 658	0 . 547	0 . 392	0 . 929	-



Οι τρεις επαναλήψεις που έγιναν και για τον γαμετοκλώνο F1-15-14 Θ.Α. έδωσαν τιμές απορρόφησης χαμηλότερες (0,519, 0,530 και 0,850) σε σχέση με εκείνες που καταγράφηκαν στους μολυσμένους μάρτυρες (3,033, 3,078 και 2,139) και παρόμοιες με εκείνες των υγιών μαρτύρων (0,819, 0,395 και 0,769) (Πίνακας 23, Εικόνα 30).

Πίνακας 23. Καταγραφή των τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από την αξιολόγηση του γαμετόκλωνου F1-15-14 Θ.Α. έναντι της φυλής Υ^N του PVY.

Γαμετόκλωνος	Απορρόφηση (OD=405nm)					
	Α. Επανάληψη		Β. Επανάληψη		Γ. Επανάληψη	
	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός
F1-15-14 Θ.Α.	0 . 519	0 . 624	0 . 530	-	0 . 897	0 . 745
F1-15-14 Θ.Α.	-	-	-	-	0 . 804	-
Μ. Ο.	0 . 519	0 . 624	0 . 530	-	0 . 850	0 . 745

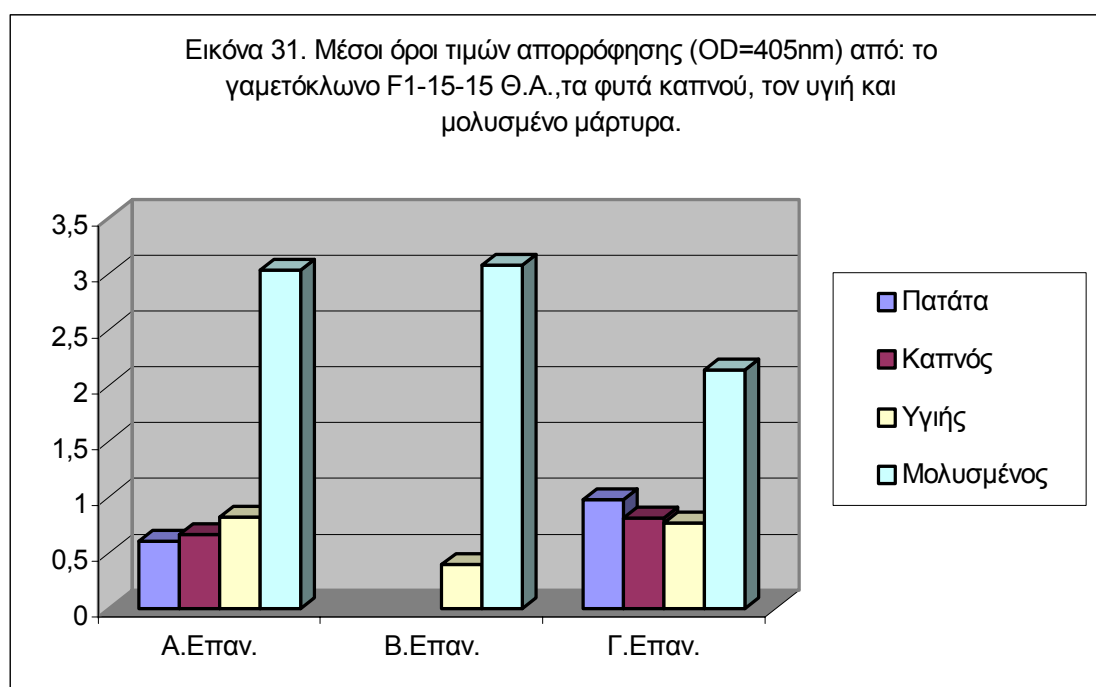


Οι τιμές απορρόφησης που καταγράφηκαν για το γαμετόκλωνο F1-15-15 Θ.Α. ήταν 0,607 και 0,977 για την Α και Γ επανάληψη, αντίστοιχα, ενώ στα φυτά καπνού για τις ίδιες επαναλήψεις σημειώθηκαν τιμές απορρόφησης 0,665 και 0,818. Οι τιμές απορρόφησης για τους υγιείς μάρτυρες (0,819 και 0,769) κυμαίνονταν στα ίδια περίπου επίπεδα, ενώ οι τιμές των μολυσμένων μαρτύρων (3,033 και 2,139) ήταν πολύ μεγαλύτερες (Πίνακας 24, Εικόνα 31).

Πίνακας 24. Καταγραφή των τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από την αξιολόγηση του γαμετόκλωνου F1-15-15 Θ.Α. έναντι της φυλής Y^N του PVY.

Γαμετόκλωνος	Απορρόφηση (OD=405nm)					
	Α. Επανάληψη		Β. Επανάληψη		Γ. Επανάληψη	
	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός
F1-15-15 Θ.Α.	0 . 607	0 . 665	-	-	0 . 956	0 . 787
F1-15-15 Θ.Α.	-	-	-	-	0 . 999	0 . 849
Μ. Ο.	0 . 607	0 . 665	-	-	0 . 977	0 . 818

Εικόνα 31. Μέσοι όροι τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από: το γαμετόκλωνο F1-15-15 Θ.Α., τα φυτά καπνού, τον υγιή και μολυσμένο μάρτυρα.

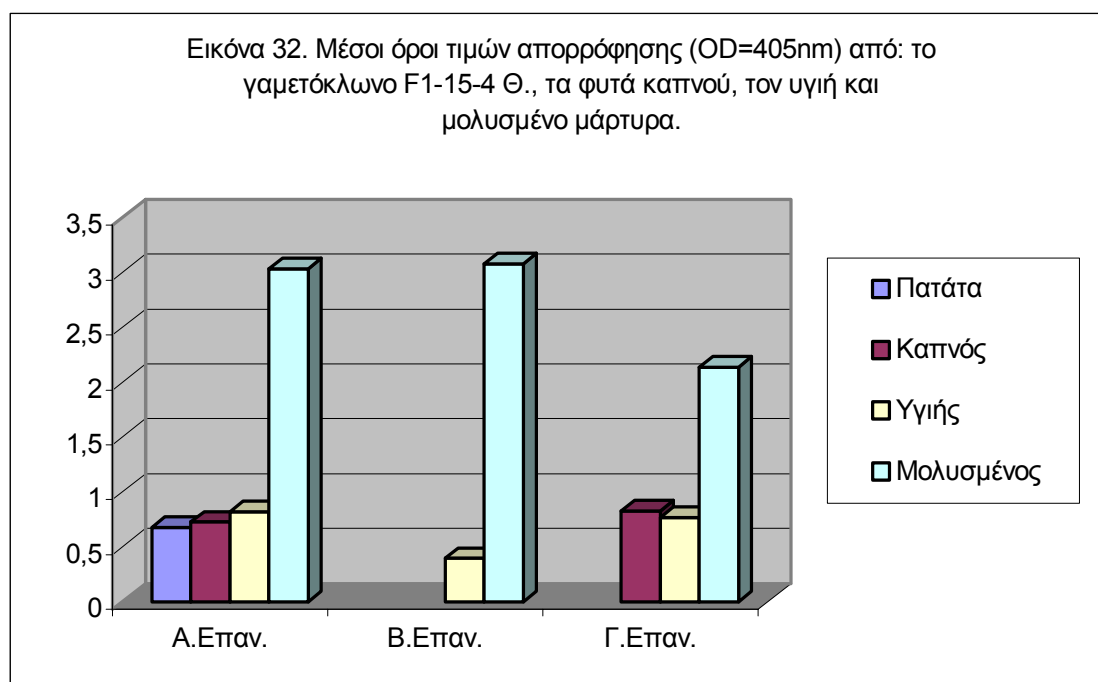


Η τιμή απορρόφησης για το γαμετόκλωνο F1-15-4 Θ. ήταν παρόμοια (0,675) με εκείνες που σημειώθηκαν στα φυτά καπνού (0,724 και 0,828) και εξαιρετικά μικρότερη σε σχέση με εκείνες των μολυσμένων μαρτύρων (3,033 και 2,139) για την Α και Γ επανάληψη (Πίνακας 25, Εικόνα 32).

Πίνακας 25. Καταγραφή των τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από την αξιολόγηση του γαμετόκλωνου F1-15-4 Θ. έναντι της φυλής Y^N του PVY.

Γαμετόκλωνος	Απορρόφηση (OD=405nm)					
	Α. Επανάληψη		Β. Επανάληψη		Γ. Επανάληψη	
	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός
F1-15-4 Θ.	0 . 675	0 . 724	-	-	-	0 . 809
F1-15-4 Θ.	-	-	-	-	-	0 . 848
Μ. Ο.	0. 675	0 . 724	-	-	-	0 . 828

Εικόνα 32. Μέσοι όροι τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από: το γαμετόκλωνο F1-15-4 Θ., τα φυτά καπνού, τον υγιή και μολυσμένο μάρτυρα.

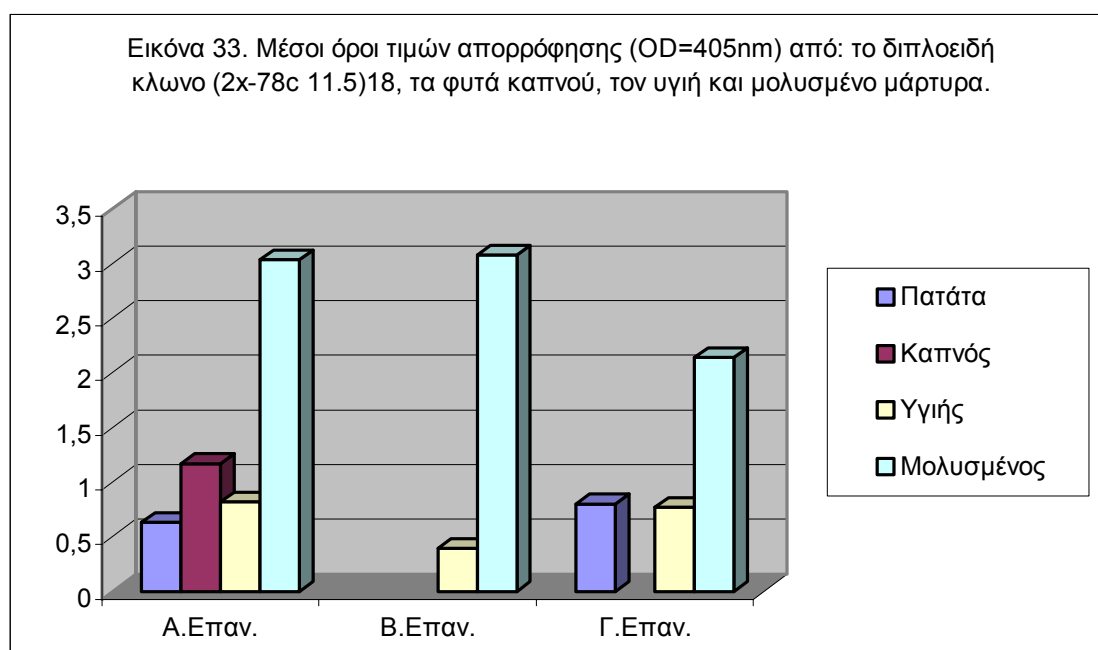


Η συμπεριφορά του διπλοειδούς κλώνου $(2x - 78c 11.5)_{18}$ (έναντι της φυλής Y^N του PVY) διαφοροποιήθηκε σε σχέση με εκείνη που εμφάνισαν οι προαναφερθέντες γαμετόκλωνοι. Συγκεκριμένα οι τιμές απορρόφησης, που καταγράφηκαν στην Α επανάληψη για τα δείγματα καπνού (1,169), αλλά και εκείνες που έδωσαν τα δείγματα του προαναφερόμενου κλώνου (0,800) στην Γ επανάληψη ήταν μεγαλύτερες από τις τιμές απορρόφησης του υγιούς μάρτυρα (0,819 στην Α και 0,769 στην Γ επανάληψη). Αντίθετα οι μολυσμένοι μάρτυρες έδωσαν πολύ υψηλότερες τιμές (3,033 και 2,139 στην Α και Γ επανάληψη, αντίστοιχα) (Πίνακας 26, Εικόνα 33).

Πίνακας 26. Καταγραφή των τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από την αξιολόγηση του διπλοειδούς κλώνου $(2x-78c 11.5)_{18}$ έναντι της φυλής Y^N του PVY.

Διπλοειδής Κλώνος	Απορρόφηση (OD=405nm)					
	Α. Επανάληψη		Β. Επανάληψη		Γ. Επανάληψη	
	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός
$(2x-78c 11.5)_{18}$	0 . 632	1 . 701	-	-	0 . 800	-
$(2x-78c 11.5)_{18}$	-	0 . 638	-	-	-	-
Μ. Ο.	0 . 632	1 . 169	-	-	0 . 800	-

Εικόνα 33. Μέσοι όροι τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από: το διπλοειδή κλωνο $(2x-78c 11.5)_{18}$, τα φυτά καπνού, τον υγιή και μολυσμένο μάρτυρα.

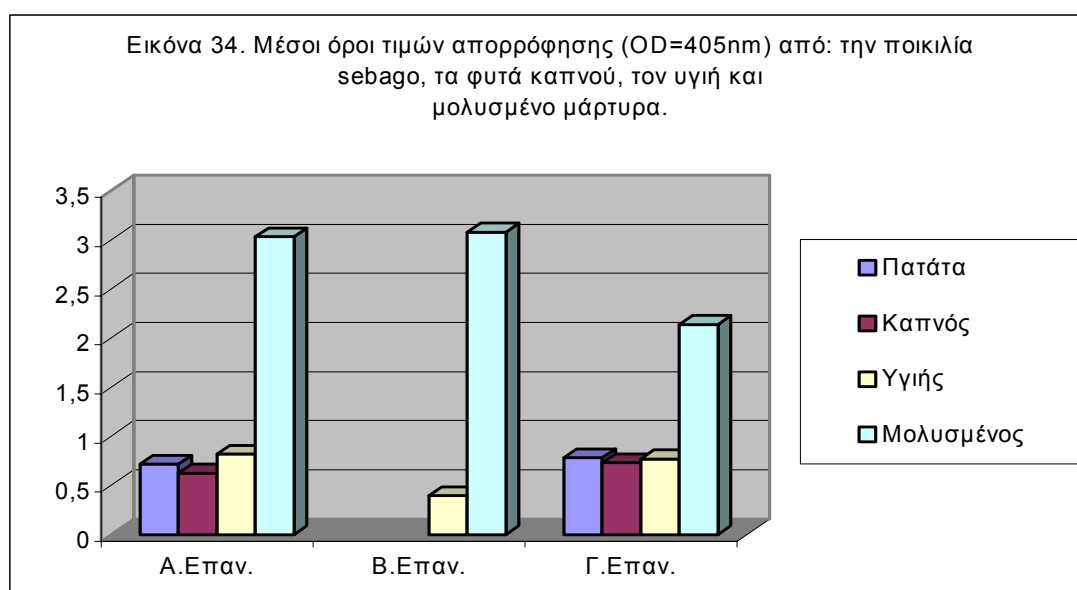


Από την αξιολόγηση της συμπεριφοράς της ποικιλίας sebage έναντι του PVY, προκύπτει ότι οι τιμές απορρόφησης που καταγράφηκαν στα δείγματα πατάτας και καπνού τόσο στην Α (0,717 πατάτα και 0,624 καπνός) όσο και στην Γ επανάληψη (0,780 πατάτα και 0,731 καπνός) ήταν περίπου ίδιες με εκείνες που σημειώθηκαν στους υγιείς μάρτυρες (0,819 στην Α και 0,769 στην Γ επανάληψη). Οι τιμές απορρόφησης των μολυσμένων μαρτύρων ήταν εξαιρετικά υψηλότερες (3,033 στην Α και 2,139 στην Γ επανάληψη) (Πίνακας 27, Εικόνα 34).

Πίνακας 27. Καταγραφή των τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από την αξιολόγηση της ποικιλίας sebage έναντι της φυλής Y^N του PVY.

Ποικιλία	Απορρόφηση (OD=405nm)					
	Α. Επανάληψη		Β. Επανάληψη		Γ. Επανάληψη	
	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός
Sebage	0 . 648	0 . 614	-	-	0 . 728	0 . 729
Sebage	0 . 786	0 . 634	-	-	0 . 798	0 . 775
Sebage	-	-	-	-	0 . 738	0 . 734
Sebage	-	-	-	-	0 . 776	0 . 688
Sebage	-	-	-	-	0 . 827	-
Sebage	-	-	-	-	0 . 838	-
Sebage	-	-	-	-	0 . 683	-
Sebage	-	-	-	-	0 . 817	-
Sebage	-	-	-	-	0 . 766	-
Sebage	-	-	-	-	0 . 831	-
Μ. Ο.	0 . 717	0 . 624	-	-	0 . 780	0 . 731

Εικόνα 34. Μέσοι όροι τιμών απορρόφησης (OD=405nm) από: την ποικιλία sebage, τα φυτά καπνού, τον υγιή και μολυσμένο μάρτυρα.



Πίνακας 28. Μέσοι όροι των τιμών απορρόφησης (OD=405nm) στα φυτά πατάτας σε τρεις επαναλήψεις.

Γαμετόκλωνος	Μ. Ο. Απορρόφησης (OD=405nm)					
	Α. Επανάληψη		Β. Επανάληψη		Γ. Επανάληψη	
	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός	Πατάτα	Καπνός
H2-258-23 Θ.Α.	0 . 821	0 . 669	0 . 487	0 . 453	-	-
H2-258-33 Θ. Α.	-	0 . 739	-	-	-	-
H2-258-40 Θ. Α.	-	0 . 673	-	0 . 427	-	-
H2-258-43 Θ. Α.	0 . 680	0 . 619	-	-	0 . 873	-
H2-258-45 Θ. Α.	0 . 657	0 . 642	-	0 . 605	-	-
H2-258-54 Θ. Α.	0 . 700	0 . 813	0 . 549	0 . 491	0 . 864	-
H2-258-2 Θ.	-	0 . 668	-	-	-	-
H2-258-6 Θ.	-	0 . 622	-	-	-	-
F1-15-2 Θ. Α.	0 . 649	0 . 557	0 . 456	0 . 499	0 . 908	-
F1-15-3 Θ. Α.	0 . 771	0 . 710	0 . 459	0 . 454	0 . 902	-
F1-15-10 Θ. Α.	0 . 663	0 . 712	0 . 471	0 . 446	0 . 929	-
F1-15-12 Θ. Α.	0 . 632	0 . 574	0 . 428	0 . 426	0 . 806	-
F1-15-13 Θ. Α.	0 . 657	0 . 658	0 . 547	0 . 392	0 . 929	-
F1-15-14 Θ. Α.	0 . 519	0 . 624	0 . 530	-	0 . 850	0 . 745
F1-15-15 Θ. Α.	0 . 607	0 . 665	-	-	0 . 977	0 . 818
F1-15-4 Θ.	0 . 675	0 . 724	-	-	-	0 . 828
(2x-78c 11.5) ₁₈	0 . 632	1 . 169	-	-	0 . 800	-
Sebago	0 . 717	0 . 624	-	-	0 . 780	0 . 731

Με βάση τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα ο γαμετόκλωνος F1-15-13 Θ.Α. παρουσίασε τη μικρότερη τιμή απορρόφησης (0,392) αξιολογούμενος σε φυτό καπνού, ενώ την υψηλότερη τιμή απορρόφησης (1,169) εμφάνισε ο διπλοειδής κλώνος (2x – 78c 11.5)₁₈.

Πίνακας 29. Μέσοι όροι απορρόφησης των υγιών και μολυσμένων μαρτύρων.

Μάρτυρες	Μ. Ο. Απορρόφησης (OD = 405nm)		
	Α. Επανάληψη	Β. Επανάληψη	Γ. Επανάληψη
Υγιής (H)	0 . 819	0 . 395	0 . 769
Μολυσμένος (INF)	3 . 033	3 . 078	2 . 139

4. Συζήτηση – Συμπεράσματα

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την αξιολόγηση των γαμετοκλωνικών φυτών πατάτας με τη δοκιμή DAS – ELISA έναντι της φυλής Υ^N του ιού Υ της πατάτας, προκύπτουν τα παρακάτω:

Οι γαμετόκλωνοι (H2-258-23 Θ.Α., H2-258-33 Θ.Α., H2-258-40 Θ.Α., H2-258-43 Θ.Α., H2-258-45 Θ.Α., H2-258-54 Θ.Α., H2-258-2 Θ. και H2-258-6 Θ.), που προήλθαν από το φυτό “δωρητή” H2-258 αντέδρασαν με τον ίδιο περίπου τρόπο. Δηλαδή, οι τιμές απορρόφησης που προέκυψαν και στις τρεις επαναλήψεις ήταν πολύ μικρότερες σε σχέση με εκείνες των θετικών - μολυσμένων μαρτύρων (3,033, 3,078 και 2,139), ενώ κυμάνθηκαν στα ίδια περίπου επίπεδα με τις τιμές των αρνητικών – υγιών μαρτύρων (0,819, 0,395 και 0,769). Τα φυτά των γαμετοκλώνων αυτών δεν μολύνθηκαν από τη φυλή Υ^N του ιού Υ (PVY)^N, επομένως θεωρούνται ανθεκτικά.

Με τον ίδιο τρόπο συμπεριφέρθηκαν και τα φυτά των γαμετοκλώνων : F1-15-2 Θ.Α., F1-15-3 Θ.Α., F1-15-10 Θ.Α., F1-15-12 Θ.Α., F1-15-13 Θ.Α., F1-15-14 Θ.Α., F1-15-15 Θ.Α. και F1-15-4 Θ., που προήλθαν από το φυτό “δωρητή” F1-15. Και στις τρεις επαναλήψεις προέκυψαν τιμές απορρόφησης πολύ μικρότερες από τις τιμές απορρόφησης των θετικών – μολυσμένων μαρτύρων, ενώ οι ίδιες τιμές κυμάνθηκαν στα ίδια περίπου επίπεδα με εκείνες των αρνητικών – υγιών μαρτύρων. Επομένως είναι βέβαιο ότι στα φυτά των παραπάνω γαμετοκλώνων δεν μεταφέρθηκαν ισοσμάτια της φυλής Υ^N του ιού Υ (PVY)^N διαμέσου των μολυσμένων αφίδων.

Από την αξιολόγηση του διπλοειδούς κλώνου (2x – 78c 11.5)₁₈ καταγράφηκαν τιμές απορρόφησης μικρότερες από τις τιμές απορρόφησης που έδωσε ο μολυσμένος μάρτυρας. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο παραπάνω κλώνος, παρά το γεγονός ότι διαθέτει ανοσία στον ιό Υ της πατάτας, από την παρούσα αξιολόγηση του προκύπτει, ότι μόνο στην Α επανάληψη έδωσε τιμή απορρόφησης (0,632) μικρότερη από εκείνη του υγιούς μάρτυρα (0,819). Αντίθετα στην ίδια επανάληψη τα φυτά καπνού, αλλά και εκείνα της πατάτας (Γ επανάληψη), έδωσαν τιμές απορρόφησης (1,169 και 0,800) μεγαλύτερες

από εκείνες του υγιούς μάρτυρα (0,819 και 0,769). Επομένως η ανοσία του διπλοειδούς κλώνου έναντι του PVY επιβεβαιώθηκε μόνο στην Α επανάληψη.

Από την αξιολόγηση της ποικιλίας sebage προέκυψε ότι οι τιμές απορρόφησης ήταν μικρότερες από τις τιμές απορρόφησης του μολυσμένου μάρτυρα και σχεδόν όμοιες με εκείνες του υγιή μάρτυρα. Επομένως και τα φυτά της ποικιλίας sebage δεν μολύνθηκαν από τη φυλή Y^N του ιού Y (PVY)^N.

5. Γενικά συμπεράσματα

Ο μακροσκοπικός ιολογικός έλεγχος, που έγινε στο σύνολο των μικροπολλαπλασιασθέντων γαμετοκλωνικών φυταρίων έδωσε αρνητικά αποτελέσματα για την παρουσία πρωτογενών συμπτωμάτων έναντι της φυλής Υ^N του PVY.

Αρνητικός επίσης υπήρξε ο έλεγχος των ανδρογενετικών φυτών με τη δοκιμή ELISA, καθόσον σε όλα τα δείγματα οι τιμές απορρόφησης στα 405 nm ήταν πολύ μικρότερες από εκείνες του θετικού – μολυσμένου μάρτυρα και σχεδόν όμοιες με εκείνες του υγιούς.

Η ανθηροκαλλιέργεια είναι ένα αποτελεσματικό μέσο για τη δημιουργία απλοειδών φυτών στην πατάτα και τα ευεργετήματα της επιβεβαιώνονται και στην παρούσα πειραματική μελέτη.

Η ανθεκτικότητα έναντι της φυλής Υ^N του ιού Υ της πατάτας όχι μόνο δεν χάνεται κατά τη διαδικασία μείωσης του επιπέδου πλοειδίας αλλά μεταφέρεται και διατηρείται στα ανδρογενετικά φυτά.

Η έκλυση γαμετοκλωνικής παραλλακτικότητας (που σχετίζεται με εκδήλωση ανθεκτικότητας έναντι της φυλής Υ^N του PVY) από ευπαθή φυτά “δωρητές” επιβεβαιώνει την υπόθεση ότι η ανθηροκαλλιέργεια οδηγεί όχι μόνο στη δημιουργία ανθεκτικών γαμετοκλώνων αλλά οι ανθεκτικότητες αυτές διατηρούνται και στις επόμενες γενιές.

Και με την παρούσα μελέτη τεκμηριώθηκε η δυνατότητα αξιοποίησης της ανθηροκαλλιέργειας στα προγράμματα γενετικής βελτίωσης της πατάτας που στοχεύουν στη δημιουργία ανθεκτικών φυτών έναντι του PVY^N.

6. Βιβλιογραφία

- Άγνωστος, 1998. Πατάτα, οδηγός καλλιέργειας πατάτας. σελ. 142. Εκδόσεις Ζευς. Αθήνα.
- Αυγελής Α., Ν. Ροδιτάκης, Γ. Γραμματικάκη και Ν. Πατεράκης, 1995. Ιολογικά προβλήματα της πατάτας στο οροπέδιο Λασιθίου. Γεωργία - Κτηνοτροφία 8: 53-63.
- Buchen C. – Osmond, 1987a. Potato A *potyvirus*. p. 1004 – 1006. In. A. A. Brunt, K. Crabtree, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs and L. Watson (eds.). Viruses of plants. Descriptions and Lists from the VIDE Database. CAB International.
- Buchen C. – Osmond, 1987b. Potato S *carlavirus*. p. 1023 – 1025. In. A. A. Brunt, K. Crabtree, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs and L. Watson (eds.). Viruses of plants. Descriptions and Lists from the VIDE Database. CAB International.
- Buchen C. – Osmond, 1987c. Potato X *potexvirus*. p. 1030 – 1033. In. A. A. Brunt, K. Crabtree, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs and L. Watson (eds.). Viruses of plants. Descriptions and Lists from the VIDE Database. CAB International.
- Γραμματικάκη Γ., Α. Sonnino και Π. Ι. Καλτσίκης, 1992. Παραγωγή διαπλοειδών και απλοειδών φυτών πατάτας (*S. tuberosum* L.) με καλλιέργεια ανθήρων *in vitro*. 4^ο Συνέδριο της Ελληνικής Επιστημονικής Εταιρείας Γενετικής Βελτίωσης των Φυτών, 15-16 Οκτωβρίου, Θεσσαλονίκη, σελ. 51.
- Γραμματικάκη Γ. και Π. Ι. Καλτσίκης, 1994. Αξιολόγηση *in vivo* διαπλοειδών και απλοειδών φυτών πατάτας (*S. tuberosum* L.) προερχομένων από καλλιέργεια ανθήρων *in vitro*. 5^ο Συνέδριο της Ελληνικής Επιστημονικής Εταιρείας Γενετικής Βελτίωσης των Φυτών, 18-20 Οκτωβρίου, Βόλος, σελ. 285.
- Γραμματικάκη Γ., Π. Τσικαλός και Π. Ι. Καλτσίκης, 1995a. Αξιολόγηση γαμετοκλωνικών φυτών πατάτας σε *in vitro* συνθήκες. Πρακτικά 6^{ου}

- Συνέδριου της Ελληνικής Επιστημονικής Εταιρείας Γενετικής Βελτίωσης των Φυτών, Φλώρινα 2 - 4 Οκτωβρίου, σελ. 389-395.
- Γραμματικάκη Γ., Α. Αυγελής και Π. Ι. Καλτσίκης, 1995b. Συμπεριφορά γαμετοκλωνικών φυτών πατάτας έναντι της φυλής Y^N του ιού Y της πατάτας. 6^ο Συνέδριο της Ελληνικής Επιστημονικής Εταιρείας Γενετικής Βελτίωσης των Φυτών, 2 - 4 Οκτωβρίου, Φλώρινα, σελ. 30.
- Γραμματικάκη Γ., 1999. Αξιοποίηση νέων τεχνολογιών στην παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού πατάτας (*Solanum tuberosum* L.). Γεωτεχνικά επιστημονικά θέματα. 1:114 – 125.
- De Box J. A., 1987. Potato M *carlavirus* p.1018-1022. In. A. A. Brunt, K. Crabtree, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs and L. Watson (eds.). Viruses of plants. Descriptions and Lists from the VIDE Database. CAB. International.
- Foxe, M. J., 1992. Breeding for viral resistance: conventional methods. Neth. J. Pl. Path. 2:13-20.
- Grammatikaki G., A. Avgelis, P.I. Kaltsikes and A. Sonnino, 1997. Behaviour of potato gametoclonal plants against PVY^N. Proceedings Conference European Association for Potato Research. Section Breeding and Varietal Assesment and EUCARPIA - Potato Section. "Adaptation of potato to less favourable environments: Molecular and Genetic Approaches". March 10-12, Viterbo, Italy, pp 29.
- Grammatikaki G., A. Avgelis, P.J. Kaltsikes and A. Sonnino, 2002. Analysis of gametoclonal variation for behaviour against PVY^N in potato (*Solanum tuberosum* L.). Genetics & Breeding (in press).
- Hawkes J. C., 1992. History of the potato. p.1-12. In. P. M. Harris (ed.). The potato crop. The scientific basis for improvement. Halsted Press. New York.
- Howard, H. W., 1970. Genetics of the potato. Logos Press Ltd. London.
- Jacobsen E., and S. K. Sopory, 1978. The influence and possible recombination of genotypes on the production of microspore embryoids in anther cultures of *Solanum tuberosum* and dihaploid hybrids. Theor. Appl. Genet. 52:119 – 123.

Juzepczuk, S. W. and Bukasov, S. M., 1929. A contribution to the question of the origin of the potato. Proc. USSR Congr. Genet. Pl. and Animal Breed., 3:593 – 611.

Καλτσίκης Ι. Π., 1992. Ειδική βελτίωση φυτών, σελ. 394. Εκδόσεις Α. Σταμούλης. Πειραιάς.

Murashige T. and Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15:473 – 497.

Ντόγρας Κ., 2000 – 2001. Λαχανοκομία Ι μέρος Α. στοιχεία βιολογίας και καλλιέργειας της πατάτας. Τμήμα εκδόσεων Πανεπιστημιακό τυπογραφείο. Θεσσαλονίκη.

Πατακιούτας Γ., 1996. Πιστοποιημένος πατατόσπορος. Σποροπαραγωγή στην Ελλάδα, σελ. 24-25. Πατάτα 97. Γεωργική Τεχνολογία. Αθήνα.

Ross H., 1986. Potato breeding – problems and perspectives. J. Pl. Breed. (Supplement): 1-132.

Swaminathan, M. S., 1954. Nature of polyploidy in some 48 – chromosome species of the genus *Solanum section Tuberarium*. Genetics 39:59-76.

Thomas J. E., 1987. Potato leafroll *luteovirus*. p. 1014 – 1018. In. A. A. Brunt, K. Crabtree, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs and L. Watson (eds.). Viruses of plants. Descriptions and Lists from the VIDE Database CAB International.